

**LAPORAN PENELITIAN
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
Tahun Anggaran 2009**



Pengembangan tepung dan pati kasava asam dengan metode fermentatif pada medium diperkaya untuk modifikasi granula pati serta sintesis *baking behaviour*nya

Peneliti :

**Widya Dwi Rukmi Putri, STP, MP
Dr. Ir. Elok Zubaidah, MP
Dian Widya Ningtyas, STP, MP**

**Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Strategis Nasional , Nomor
:0174.0/023-04.2/XV/2009, tanggal 31 Desember 2008 dan berdasarkan SK Rektor Nomor :
160/SK/2009, tanggal 7 Mei 2009**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
NOVEMBER 2009**

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL

1. Judul : Pengembangan tepung dan pati kasava asam dengan metode fermentatif pada *medium* diperkaya untuk modifikasi granula pati serta sintesis *baking behaviournya*

2. Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Widya Dwi Rukmi P, STP, MP
b. Jenis Kelamin : Perempuan
c. NIP : 19700504 1999032002
d. Jabatan Fungsional : Penata Muda Tk. I/Lektor
e. Jabatan Struktural : Staf Pengajar
f. Bidang Ilmu : Teknologi Pengolahan
g. Fakultas / Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian / Teknologi Pertanian
h. Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya, Malang
i. Tim Peneliti

NAMA DAN GELAR AKADEMIK	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1. Dr. Ir. Elok Zubaidah, MS	Mikrobiologi Pangan	Teknologi Pertanian/ THP	Universitas Brawijaya
2. Dian Widya Ningtyas, STP, MP	Bioteknologi	Teknologi Pertanian/ THP	Universitas Brawijaya


3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

a. Jangka Waktu Penelitian yang diusulkan : 1 tahun
b. Biaya total yang diusulkan : Rp. 100.000.000,-
c. Biaya yang disetujui tahun 2009 : Rp. 95.000.000,-

Mengetahui,
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Brawijaya,

Prof. Dr. Ir. Harijono, M.App.Sc
NIP 19530304 198002 1 001

Malang, 30 November 2009
Ketua Peneliti,


Widya Dwi Rukmi P, STP, MP
NIP 19700504 199903 2 002

Menyetujui,
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Brawijaya


Prof. Dr. Ir. Siti Chuslaemi, MS
NIP 19530514 198002 2 001

RINGKASAN

Bakteri asam laktat yang tumbuh dari lingkungan dan memfermentasi pati kasava asam berperan terhadap karakteristik pengembangan pati tersebut. Pada skala industri, sangatlah dibutuhkan pengembangan fermentasi bakteri asam laktat dalam kondisi yang lebih terkontrol. Oleh karena itu, dibutuhkan jenis bakteri asam laktat dengan karakteristik yang sesuai untuk digunakan dalam proses fermentasi kasava tersebut serta batasan-batasan aktivitasnya sehingga dapat dimanfaatkan untuk pengembangan tepung/pati kasava dengan karakteristik 'baking expansion'. Tujuan penelitian ini adalah (1) isolasi bakteri asam laktat dari fermentasi pati kasava (2) seleksi BAL yang potensial dalam menghasilkan asam laktat dan degradasi granula pati (3) pengembangan metode fermentasi pada media pati kasava mentah yang diperkaya dengan sumber nitrogen untuk mempercepat fermentasi dan (3) mengkaji perubahan granula pati kasava hasil fermentasi isolat yang berbeda.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa selama fermentasi pati kasava tumbuh beberapa jenis bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan amilolitik. Isolat BAL yang diperoleh dari fermentasi pati kasava selama 10 hari memiliki kemampuan amilolitik yang lebih besar dibandingkan dengan isolat dari fermentasi 5 hari. Tiga jenis isolat yang memiliki karakteristik amilolitik diidentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* (isolat A4), *Lactobacillus fermentum* I (isolat B1) dan *Lactobacillus plantarum* 1 (isolat B9). Perbandingan ketiga isolat dengan isolat type culture yang diperoleh dari Food and Nutrition Culture Collection PAU UGM, menunjukkan bahwa isolat *Lactobacillus fermentum* A4 mampu tumbuh lebih baik pada pH 3 dan suhu 10°C dibandingkan isolat yang lainnya. Hasil formulasi media kasava yang difermentasi oleh isolat A4 dengan penambahan sumber nitrogen, menunjukkan bahwa kombinasi nutrien berupa yeast ekstrak : pepton dengan perbandingan 1 : 1 menghasilkan pertumbuhan BAL dan penurunan pH yang lebih cepat dibandingkan dengan penambahan yeast ekstrak saja atau pepton saja.

Hasil karakterisasi mikroskopi granula pati kasava yang difermentasi dengan lima isolat berbeda, menunjukkan bahwa pada kondisi dan lama fermentasi yang sama terjadi perubahan struktur granula yang berbeda. Isolat dengan kemampuan amilolitik yang tinggi yaitu *L. fermentum* (type culture) dan *L. fermentum* A4 menghasilkan kerusakan granula yang lebih besar. Akan tetapi kerusakan granula sehingga menyebabkan terbentuknya lubang (cavity) yang besar akan menyebabkan granula pati lebih sulit memuai dan menahan gas saat proses pemanggangan. Kerusakan granula pati pada fermentasi dengan isolat *L. fermentum* A4 relatif lebih rendah sehingga kemampuan dalam mengembang terjadi lebih baik.

SUMMARY

Lactic acid bacteria naturally present in environment have many benefit: for the development of fermented food. For production at industrial scale, it is important to perform the lactic acid fermentation in controlled condition. Therefore, lactic acid bacteria with the suitable characteristics should be used in the process. The aims of this research were (1) isolation lactic acid bacteria from cassava starch fermentation, (2) Selection of potential lactic acid bacteria for production of lactic acid,(3) development of fermentation method on enrichment medium,(4) characterization of starch granule as an effects of fermentation.

The result showed that during cassava starch fermeic acid bactermtation grow several kind of amylolytic lactic acid bacteria. LAB from 10 days of fermentation had higher amylolytic ability than isolates from five days fermentation. Three isolates that had amylolytic characteristic were identified as *Lactobacillus fermentum* (isolate A4), *Lactobacillus fermentum* 1 (isolate B1) and *Lactobacillus plantarum* 1 (isolate B9) Whereas *Lactobacillus fermentum* A4 had a better ability to grow on acid medium and low temperature condition, than the other isolates.

Formulation medium enriched with yeast extract and pepton (1:1) resulted a faster LAB growth and produce lactic acid than addition medium with yeast extract and pepton by itself. Microscopic characterization of starch granule showed that fermentation with difference amylolytic ability of LAB resulted a big cavity on these granula and influence the baking characteristic of the sour cassava starch.

PRAKATA

Syukur alhamdulillah penulis ucapkan kehadiran Allah SWT yang selalu memberikan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan baik. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa rangkaian penelitian ini tidak akan berjalan dengan baik tanpa pertolongan-Nya, kemudian bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak yang terlibat dalam rangkaian proses penelitian ini. Oleh karena itu, dengan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Dana DIPA Universitas Brawijaya Tahun Anggaran 2009.
2. Lembaga Penelitian Universitas Brawijaya yang telah membantu pengurusan administrasi pada penelitian ini.
3. Pembimbing dan pimpinan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya.

Semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan untuk pengembangan ilmu selanjutnya.

PENULIS

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI.....	i
RINGKASAN	ii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Khusus.....	2
1.3 Keutamaan penelitian.....	2
II. STUDI PUSTAKA.....	5
2.1 Pati Kasava	5
2.2. Kajian awal Pati Kasava sebagai Bahan Baku Kerupuk	8
2.3 Pembuatan Tepung Kasava Terfermentasi	8
2.4 Pembuatan Tapioka Terfermentasi	10
2.5 Bakteri Asam Laktat	13
2.6 Bakteri Asam Laktat amilolitik.....	18
2.7. Asam laktat dan perannya terhadap karakteristik pati.....	20
2.8 Pengeringan matahari dan Irradiasi sinar UV	23
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	25
3.1 Tujuan penelitian.....	25
3.2 Manfaat penelitian.....	25
3.3 Pelaksanaan penelitian.....	29
IV. METODE PENELITIAN	26
4.1. Tempat dan Waktu Pelaksanaan	26
4.2. Bahan dan Alat.....	27
4.3 Metodologi Penelitian.....	28
4.4. Pelaksanaan Penelitian	32
4.5. Metode Analisis	35
4.6. Analisis data	36
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
5.1. Isolasi Bakteri Asam Laktat Amilolitik	37
5.2. Seleksi isolat BAL amilolitik dalam degradasi pati.....	41
5.3. Pengembangan metode fermentasi pati kasava.....	44
5.4. Karakterisasi pati kasava Asam	48
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
DAFTAR PUSTAKA.. ..	53
LAMPIRAN.....	60
1. Artikel Ilmiah	63
2. Artikel Jurnal Internasional	72

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. <i>Kasava (Manihot esculenta)</i>	5
Gambar 2. Skema identifikasi BAL sampai level genus	17
Gambar 3. Model skematik produksi asam laktat dari pati	19
Gambar 4. Struktur isomer D dan L asam laktat	21
Gambar 5. Bagan alir penelitian secara keseluruhan	26
Gambar 6. Bagan alir penelitian isolasi bakteri asam laktat	28
Gambar 7. Bagan alir penelitian seleksi isolate BAL	29
Gambar 8. Bagan alir penelitian pengembangan fermentasi dengan medium diperkaya	30
Gambar 9. Bagan Alir penelitian karakterisasi pati kasava asam.....	31.
Gambar 10. Kemampuan tumbuh lima isolate BAL pada berbagai suhu.....	43
Gambar 11. Perubahan pH selama fermentasi dengan penambahan sumber nitrogen	45
Gambar 12. Perubahan jumlah BAL selama fermentasi dengan penambahan sumber nitrogen	46
Gambar 13. Perbandingan pertumbuhan BAL pada berbagai jenis nutrient.....	47
Gambar 14. Kenampakan granula pati hasil fermentasi	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Indikator kinerja setiap tahapan penelitian	36
Tabel 2. Karakteristik isolat yang diisolasi dari fermentasi pati kasava selama 5 hari.....	38
Tabel 3. Karakteristik isolat yang diisolasi dari fermentasi pati kasava selama 10 hari.....	38
Tabel 4. Hasil identifikasi isolat dengan API 50 CHL.....	40
Tabel 5. Karakteristik pertumbuhan isolate padapH rendah	41

BAB I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Pemanfaatan umbi-umbian sebagai pengganti terigu dan beras sudah menjadi isu nasional sejak semakin bertambahnya impor terigu dan beras dari tahun ke tahun. Substitusi berbagai produk berbasis tepung terigu ataupun tepung beras dengan tepung ubi kayu dan ubi jalar juga telah banyak dilakukan, akan tetapi tidak dapat menggantikan hingga seratus persennya, terutama untuk produk-produk yang membutuhkan tingkat pengembangan volume yang besar seperti pada roti. Hal ini menyebabkan produksi tepung ubi kayu, tepung ubi jalar maupun produk patinya masih terbatas dan belum banyak berkembang.

Secara tradisional tapioka asam juga diproduksi oleh industri rakyat di Indonesia sebagai bahan baku kerupuk, sedangkan pembuatan tepung kasava asam sebagai bahan utama produk bakeri masih belum dikembangkan. Tahap-tahap proses pembuatan tepung kasava maupun tapioka terfermentasi secara tradisional meliputi fermentasi alami kasava atau pati kasava kemudian pengeringan matahari. Proses fermentasi pada pembuatan pati kasava asam dapat memberikan karakteristik pengembangan terhadap baking. Berbagai produk tepung yang telah dikembangkan dari kasava, diantaranya tepung kasava terfermentasi (MOCAF, Witono (2008)) berpotensi untuk substitusi terigu pada pembuatan mie dan biskuit, namun sifatnya yang tidak mengembang pada *baking* (pemanggangan) mengakibatkan kurang berpotensi menggantikan terigu untuk pembuatan roti.

Fermentasi alami pada pembuatan pati kasava asam menghasilkan karakteristik produk yang tidak stabil serta proses berjalan lama, sehingga diperlukan modifikasi metode dengan menggunakan isolat bakteri asam laktat (BAL) yang memiliki kemampuan tumbuh dengan baik pada medium pati kasava. Kemampuan bakteri asam laktat untuk tumbuh pada media berpati sangat dipengaruhi oleh kemampuannya dalam memanfaatkan pati sebagai substratnya. Selain itu kecepatan tumbuh juga dipengaruhi nutrient yang terkandung dalam medium tersebut. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat yang indigenous sangat penting untuk mendapatkan BAL yang potensial untuk tumbuh cepat pada media kasava dan menghasilkan asam laktat, serta menghasilkan pati kasava yang memiliki kemampuan mengembang pada baking.

1.2. Tujuan khusus

Tujuan penelitian adalah modifikasi granula pati dengan metode fermentatif untuk mendapatkan pati kasava asam dengan karakteristik pengembangan besar pada baking (*baking behaviour*). Penelitian ini diharapkan akan memperbaiki tahapan fermentasi pada produksi tepung kasava dan tapioka asam sehingga dapat diterapkan pada skala industri kecil dan besar.

1.3 Keutamaan Penelitian

Kebutuhan akan tepung untuk berbagai produk bakeri menjadi salah satu penyebab meningkatnya impor terigu nasional. Salah satu cara untuk mendukung ketahanan pangan adalah dengan memanfaatkan umbi-umbian lokal Indonesia untuk produksi tepung yang memiliki kemampuan mengembang (*baking behaviour*). Kasava

(kasava) paling berpotensi dikembangkan menjadi tepung sebagai bahan baku utama produk roti dan sejenisnya, karena industri pengolahnya (industri pati kasava (tapioka)) telah ada di Indonesia dan hanya perlu dilakukan modifikasi pada tahapan prosesnya. Modifikasi proses ini sekaligus dilakukan untuk menghilangkan senyawa racun glikosida sianogenik yang terkandung dalam umbi kasava terutama jenis kasava pahit (*bitter cassava*).

Untuk bisa menyamai tepung terigu maka perlu dilakukan perubahan karakteristik tepung dan pati kasava sehingga kemampuan mengembangnya saat baking menjadi lebih baik. Proses pembuatan tapioka asam secara tradisional meliputi pengupasan kulit luar, penghancuran, pengendapan dan fermentasi, yang selanjutnya dikeringkan dengan sinar matahari. Pengendapan pati kasava dilakukan dengan perendaman dalam air selama waktu 20-70 hari, selanjutnya pati dikeringkan dengan sinar matahari selama 1-2 hari. Saat perendaman, terjadi fermentasi yang melibatkan mikroorganisme penghasil asam laktat (Guyot *et al.*, 2003; Lacerda *et al.*, 2005), selama fermentasi ini pula terjadi degradasi senyawa glikosida sianogenik (Lei *et al.*, 1999). Perubahan struktur ikatan pada pati oleh asam laktat dan terjadinya oksidasi karena sinar matahari mempengaruhi sifat pengembangan yang dimiliki oleh pati kasava asam (Bertolini *et al.*, 2001).

Fermentasi yang relatif lama serta kualitas produk yang bervariasi sangat mungkin disebabkan karena kondisi prosesing yang tidak terkontrol karena proses berjalan secara alami. Penggunaan bakteri asam laktat (BAL) sebagai starter diharapkan dapat memperbaiki proses untuk mendapatkan mutu yang lebih dipercaya serta dengan proses yang lebih cepat. Kajian mikrobiologis pada fermentasi alami pati kasava asam

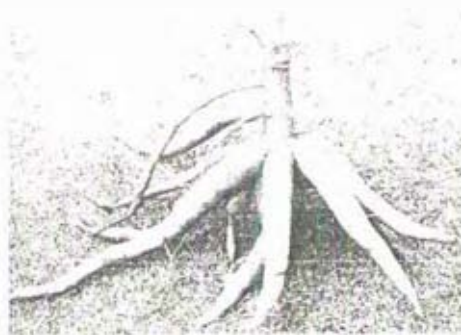
produksi industri di Columbia mengarah kepada isolasi bakteri asam laktat amilolitik, *L. manihotivorans* yang bersifat homolaktik menghasilkan lebih dari 98% L(+)-asam laktat (Marlon-Guyot *et al.*, 1998), sedangkan Lacerda *et al.* (2005) menemukan *L. plantarum* dan *L. fermentum* yang dominan pada fermentasi alami di 2 pabrik di Brazil, selain itu juga menemukan *L. perolans* dan *L. brevis*. Selanjutnya, hasil isolasi Anike and Okafor (2008) menunjukkan bahwa *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus sp.* menghasilkan kadar metionin yang tertinggi pada kasava terfermentasi, yang menunjukkan kemampuan bakteri tersebut pada media berbasis kasava. Akan tetapi metode fermentatif dengan bakteri asam laktat pada medium yang diperkaya belum dikaji lebih dalam, oleh karena itu penelitian tentang penggunaan bakteri asam laktat hasil isolasi dari air perendaman industri tapioka rakyat untuk fermentasi hancuran kasava perlu dilakukan untuk mendapatkan tepung dan pati kasava asam yang mengembang besar pada *baking*.

BAB II. STUDI PUSTAKA

Pada tulisan ini, digunakan istilah kasava (umbi *Manihot esculenta* Cranz); istilah lainnya kasava, singkong atau ketela pohon. Digunakan istilah tepung kasava, seperti yang sudah lazim digunakan di pasaran, untuk membedakan terhadap pengertian tepung gaplek. Tepung gaplek dibuat dari gaplek, yaitu kasava kering yang umumnya berciri warna dan bau yang kurang disukai dibanding tepung kasava. Istilah pati kasava dimaksudkan pati ekstrak yang belum dikeringkan, sedangkan produk keringnya berupa tapioka.

2.1 Pati Kasava

Pati kasava merupakan salah satu bagian yang dimanfaatkan dari tanaman kasava dan biasanya hanya digunakan dalam pembuatan kerupuk atau produk yang lainnya. Pati kasava mengandung amilosa 17% dan amilopektin 83% dengan ukuran granula 5-35 mikron. (Winarno, 1992).



Gambar 1. Kasava ((*Manihot esculenta*) (Anonymous^a, 2009)

Tabel 1. **Komposisi kimia Pati kasava (per 100 gram bahan) :**

Komponen	Jumlah
Kalori (Kal)	362
Air (g)	12
Karbohidrat (g)	86.9
Protein (g)	0.5
Lemak (g)	0.3
Kalsium (mg)	0
Fosfor (mg)	0
Besi (mg)	0
Vitamin B1 (mg)	0.12

Sumber : Astawan (2004)

Untuk mendapatkan hasil pati yang berkualitas maka proses pengolahannya pun harus baik. Terdapat beberapa tahapan proses untuk mendapatkan pati kasava yaitu pemecahan sel meliputi proses penghancuran ubi kayu, pengambilan pati melalui proses ekstraksi (pemerasan) dan penambahan air.

Proses pembuatan pati kasava antara lain (Anonymous^b,2007):

1. Pengupasan

Pengupasan dilakukan dengan cara **manual** yang bertujuan untuk memisahkan daging kasava dari kulitnya. Selama pengupasan, sortasi juga dilakukan untuk memilih kasava yang berkualitas tinggi dari kasava lainnya misalnya bagian yang sudah mengeras, tangkai umbi dan cacat fisik. Kasava yang telah dikupas harus secepatnya direndam dalam air bersih agar tidak berubah warna menjadi coklat akibat reaksi **browning** (Pencoklatan).

2. Pencucian

Pencucian dilakukan dengan cara manual yaitu dengan meremas-remas atau mengosok-gosok kasava di dalam bak yang berisi air yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran pada kasava.

3. Pamarutan

Tujuan proses pamarutan adalah untuk memperkecil volume dari ubi kayu agar lebih mudah diekstrak patinya. Pamarutan dilakukan dengan 2 cara yaitu :

- a. Pamarutan manual, dilakukan dengan cara tradisional yang memanfaatkan tenaga manusia sepenuhnya.
- b. Pamarutan mesin, digerakkan dengan generator.

4. Pemerasan/Ekstraksi

Pemerasan dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu :

- a. Pemerasan bubur kasava yang dilakukan dengan cara manual menggunakan kain saring. Kemudian diremas dengan menambahkan air dimana cairan yang diperoleh adalah pati yang ditampung dalam wadah.
- b. Pemerasan bubur kasava dengan saringan goyang (sintrik). Bubur kasava diletakkan di atas saringan yang digerakkan dengan mesin. Pada saat saringan tersebut bergoyang, kemudian ditambahkan air melalui pipa berlubang. Pati yang dihasilkan ditampung dalam wadah pengendapan.

5. Pengendapan

Pati hasil ekstraksi diendapkan dalam wadah pengendapan selama 4 jam. Air di bagian atas endapan dialirkan dan dibuang, sedangkan endapan diambil.

22. Kajian awal pati kasava sebagai bahan baku kerupuk

Akhir-akhir ini kekurangan pasokan tapioka dialami oleh industri-industri besar sejenis kerupuk, kacang atom dan pilus. Tapioka yang dibutuhkan ialah yang memiliki ciri pengembangan besar pada penggorengan maupun *baking*. Dikenal istilah tapioka rakyat, yang mengembang besar pada penggorengan maupun *baking*, dan tapioka pabrik yang kurang mengembang. Untuk mendorong pengembangan tapioka, industri menambahkan aluin. Pati pramasak yang jauh mengembang lebih besar berasal dari impor, juga digunakan oleh industri besar.

Tapioka rakyat dibuat melalui tahap-tahap pengupasan kasava, pamarutan, penyaringan, pengendapan dan pengeringan matahari yang lama. Tapioka pabrik dibuat dengan prinsip yang sama namun lebih cepat, tanpa pengendapan dan pengeringan matahari. Kajian pustaka mengindikasikan bahwa kombinasi perlakuan pengendapan yang lama dan pengeringan matahari menghasilkan tapioka yang mengembang besar pada *baking* seperti dilaporkan oleh Camargo *et al.* (1988), akibat peristiwa fermentasi dan iradiasi sinar UV matahari. Pengeringan pati pada suhu tinggi, seperti dilakukan oleh pabrik besar, justru mengakibatkan pati sulit mengembang, seperti fenomena yang terjadi pada pemanasan tapioka (Xu dan Seib, 1993), juga pada pengeringan pasta (Zweifel *et al.*, 2000) dan pati jagung (Altay dan Gunasekaran, 2006).

23. Pembuatan tepung kasava terfermentasi

Kasava sudah diterima oleh sebagian penduduk dunia sebagai bagian pangan pokok. Kasava mengandung racun glukosida sianogenik sekitar 79,8 mg HCN/1 kg (Nwabueze dan Odunsi, 2007). Perendaman kasava kupas adalah salah satu cara efisien

untuk mengurangi racun sianogenik. Selama perendaman terjadi pelarutan glukosida sianogenik, maupun fermentasi yang mempercepat pengurangan racun tersebut dan menyumbangkan cita-rasa yang disukai.

Fermentasi kasava di Afrika dilakukan dengan perendaman seperti pada pembuatan *fufu*, atau fermentasi *solid state* pada pembuatan *gari*. Bakteri asam laktat, yeast dan bakteri lain selama fermentasi *fufu*, berperan dalam peruraian sebagian pati, pengasaman, detoksifikasi dan pengembangan cita-rasa. Bakteri asam laktat khususnya berperan dalam pembentukan aroma, penghambatan bakteri pembusuk dan patogen (Sobowale *et al.*, 2007).

Pengembangan pembuatan tepung kasava terfermentasi telah banyak dilakukan di Nigeria Tepung *kpor umilin* dibuat dengan fermentasi kasava kupas yang terendam air selama 3-5 hari, penirisan, penghancuran, dan pengeringan dengan sinar matahari. Bila diperlukan dapat ditumbuk menjadi tepung (Inyang *et al.*, 2006). Tepung *fufu* dibuat dari kasava kupas, dipotong-potong, direndam selama 3-4 hari, ditiris, dihancurkan, diayak, dan kemudian dikeringkan (Chukwuemeka, 2007). Pembuatan tepung *cassava lafun* telah dikembangkan dengan fermentasi kasava parut selama 3 hari dengan inokulum *Corynebacterium manihot* dan *Geotrichum candida*. Setelah fermentasi, kasava parut dikempa dengan *screw press* untuk mengurangi kadar air, kemudian dikeringkan (Nwabueze dan Odunsi, 2007). Pengembangan pembuatan tepung *fufu* meliputi tahap-tahap inokulasi dengan *Lactobacillus plantarum*, fermentasi 3-4 hari, penghancuran dan penyaringan, dekantasi, pengempaan, pengeringan, penggilingan dan pengayakan (Sobowale *et al.*, 2007). Potongan kasava terfermentasi (*gari*) juga telah diteliti oleh Anike and Okafor (2008), di mana hasil isolasi menunjukkan bahwa

Lactobacillus plantarum dan *Lactobacillus sp.* tumbuh dominan dan menghasilkan kadar metionin yang tertinggi pada gari.

MOCAL atau *modified cassava flour* dibuat dari kasava kupas, dipotong-potong dan difermentasi menggunakan bakteri asam laktat selama 3 hari, pengempaan untuk mengurangi kadar air, dan pengeringan dengan sinar matahari. Pengembangan skala industri kecil dilakukan di Trenggalek, Pati, Purwodadi dan Lampung (Yuli Witono, 2008). MOCAL sudah tidak berasa kasava, dimaksudkan untuk substitusi dalam pembuatan mi, biskuit dan cake.

Secara umum tepung kasava terfermentasi yang dihasilkan sampai saat ini bersifat belum dapat mengembang besar pada *baking*, sehingga kurang berpotensi mensubstitusi terigu untuk membuat roti. Oleh sebab itu penelitian teknologi meliputi tahap-tahap proses mekanis, mikrobiologis, dan fisis perlu dilakukan.

2.4. Pembuatan tapioka terfermentasi

Di beberapa wilayah Amerika Selatan, dikenal pati kasava asam (*sour cassava starch*, atau *polvilho azedo* di Brazil; *almidon agrio* di Columbia) yang diproduksi secara tradisional dan digunakan untuk membuat semacam roti dan biskuit yang mengembang besar, yang memiliki struktur remah yang renggang dan kerak yang renyah. Produk *baking* tersebut tanpa gluten yang dengan demikian cocok untuk dikonsumsi oleh penderita *gluten intolerant* (Camargo *et al.*, 1988).

Pati kasava asam dibuat meliputi tahap-tahap pengendapan, diikuti perendaman selama sekitar 30 hari dalam bak kayu, kemudian pengeringan matahari selama 1-2 hari. Fermentasi alami terjadi selama tahap pengendapan dan perendaman pati, menghasilkan

asam-asam, terutama asam laktat, di samping asam asetat, asam propionat dan asam butirat (Camargo *et al.*, 1988).

Sering air permukaan dari bak yang sudah digunakan untuk fermentasi, ditambahkan pada bak bersi kasava segar untuk memperbaiki mutu pati kasava asam, namun hasilnya belum konsisten. Fermentasi dengan inokulum *L. crispatus* memerlukan waktu selama 20 hari untuk mencapai hasil yang sama dengan fermentasi tradisional (Brabet *et al.*, 1999). Suhu dan kadar air selama pengeringan matahari diduga berpengaruh juga terhadap kemampuan pati kasava asam untuk mengembang pada *baking*.

Kajian mikrobiologis pada fermentasi alami pati kasava asam mengarah kepada isolasi bakteri asam laktat amilolitik, *L. manihotivorans* yang bersifat homolaktik menghasilkan lebih dari 98% L(+)-asam laktat (Marlon-Guyot *et al.*, 1998). Selama pengendapan dan perendaman pati kasava, produksi asam laktat dilakukan oleh *L. manihotivorans* yang amilolitik, dan *L. plantarum* mendominasi mikroflora alami. Kualitas produk yang bervariasi mungkin disebabkan oleh kondisi prosesing yang tidak terkontrol. Penggunaan *L. manihotivorans* sebagai starter mungkin membantu proses untuk mendapatkan mutu yang lebih dipercaya. Selama ekstraksi pati secara basah pada prosesing kasava terjadi pembuangan gula-gula. Pada kondisi ini bersama dengan produksi CO₂ merupakan kondisi yang cocok untuk sintesis amilase oleh *L. manihotivorans* meskipun demikian agaknya sangat terbatas karena kandungan sumber nitrogen dalam kasava (Guyot dan Morlon-Guyot, 2001).

Penelitian selanjutnya berhasil menemukan tujuh isolat *L. manihotivorans* pada proses produksi pati kasava asam, enam di antaranya bersifat amilolitik. Spesies OND32

dan OLB7 dapat memfermentasi sangat banyak ragam karbohidrat (Guyot *et al.*, 2003). Namun Lacerda *et al.* (2005) menemukan *L. plantarum* dan *L. fermentum* yang dominan pada fermentasi di 2 pabrik di Brazil, selain itu juga menemukan *L. perolans* dan *L. brevis*. Pada produksi tapioka rakyat di Indonesia, fermentasi pati terjadi pada pengendapan dan selanjutnya perendaman beberapa lama. Masih memungkinkan pengembangan proses untuk mendapatkan tapioka yang dapat mengembang lebih besar pada penggorengan maupun *baking*, dengan menggunakan inokulan. Sangat mungkin kondisi fermentasi alami berbeda dengan kondisi di Amerika Selatan maupun Afrika, sehingga bakteri yang berperan juga berbeda. Oleh sebab itu isolasi *Lactobacillus* sp. dari bak pengendapan tapioca rakyat, kajian mikrobiologis dan aplikasi untuk fermentasi tapioca maupun tepung kasava memberikan harapan untuk pengembangan teknologi pati kasava asam di Indonesia.

Fermentasi kasava segar dalam bentuk potongan atau hancuran memungkinkan terjadi lebih cepat karena kandungan nutrient yang lebih lengkap daripada fermentasi pati kasava. Dengan demikian teknologi fermentasi untuk membuat tapioka yang mengembang besar, sangat mungkin diterapkan untuk fermentasi kasava untuk membuat tepung kasava yang dapat mengembang pada *baking*.

Makanan khas Indonesia yang berbasis kasava terfermentasi, salah satu diantaranya adalah growol yang mirip dengan gari di Afrika. Growol merupakan hasil pemisahan pati berupa bubur (*slurry*) ubi kayu yang diperoleh melalui proses fermentasi, memiliki sifat-sifat yang lekat dan awet. Penelitian Epriliati (1994) menunjukkan bahwa selama fermentasi growol terjadi biodegradasi yang menimbulkan perubahan fisik tetapi secara kimiawi tidak menyebabkan perubahan berat molekul pati yang besar. Bentuk-

bentuk granula pati pada saat 0 – 96 jam fermentasi tidak mengalami perubahan. Selama proses perendaman terjadi perubahan granula secara jelas pada saat fermentasi 120 jam, dimana kerusakan tidak merata pada seluruh granula. Granula pati hasil fermentasi 24 sampai 120 jam setelah suhu pemanasan 70°C menunjukkan adanya kerusakan pada bagian dalam granula. Pati growol mengalami penurunan kemampuan membentuk gel dan memiliki viskositas lebih rendah daripada granula pati tanpa perendaman

Selama fermentasi growol tradisional, terjadi suksesi pertumbuhan mikrobial dalam jangka waktu lima hari dengan jumlah mikrobial yang terbesar setiap harinya berturut-turut sebagai berikut; pertama, *Streptococcus sp*, kedua, kelompok *Coryneform*, ketiga, *yeast* dan *Enterobacteriaceae*, *Bacillus sp*, *Acinetobacter sp*, keempat, *Lactobacillus* ~~juga~~ *sp*, *Moraxella sp*. Seluruh mikroorganisme tersebut ada selama fermentasi pada yang bervariasi (Rascana, 1986). Mikroorganisme dalam fermentasi growol bersifat amilolitik, penghasil gas dan asam. (Rascana, 1986; Suharni, 1988), sedangkan penelitian Hong Mea Hoa, 1987 dalam Epriliati, 1994 menunjukkan adanya sifat amilolitik dan selulolitik..

2.5. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang memproduksi asam laktat sebagai produk metabolit utamanya. BAL memiliki karakteristik produksi asam laktat dari karbohidrat melalui proses fermentasi. BAL telah digunakan untuk memfermentasi makanan sejak 4000 tahun yang lalu. Organisma ini bersifat heterotropik dan umumnya membutuhkan nutrisi yang kompleks selama pertumbuhan dan perkembangannya, karena ketidakmampuan dalam beberapa proses biosintesis. Sebagian besar spesies

membutuhkan berbagai jenis asam amino dan vitamin. Karena itu, BAL umumnya ada dalam suatu lingkungan dimana kebutuhannya dapat dipenuhi (Reddy *et al.*, 2008). BAL dimanfaatkan dalam industri makanan untuk beberapa alasan dan tujuan. Pertumbuhannya berakibat menurunkan kandungan karbohidrat bahan pangan yang difermentasi, dan penurunana pH karena produksi asam laktat. Proses asidifikasi adalah salah satu efek yang diinginkan dari pertumbuhan BAL. pH bahan pangan dapat turun hingga dibawah 4,0 yang cukup rendah untuk menghambat pertumbuhan sebagian besar mikroorganisma lain termasuk mikroba patogen, sehingga umur simpan produk dapat lebih panjang.

Bakteri asam laktat terdiri atas sejumlah genus bakteri yang termasuk famili Firmicutes, yang terdiri dari 20 genus. Genus *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactospaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* dan *Weissella* dikenal sebagai bakteri asam laktat (BAL) (Axelsson, 2004; Ercolini *et al.*, 2001; Holzapfel *et al.*, 2001; Jay, 2000; Stiles dan Holzapfel, 1997). *Lactobacillus* adalah yang terbesar dari genus-genus tersebut, yang memiliki 89 spesies yang telah dikenali. Taksonomi bakteri asam laktat didasarkan pada reaksi gram dan produksi asam laktat dari berbagai jenis karbohidrat terfermentasi. Karakteristik BAL adalah gram positif, tidak membentuk spora, katalase negative, anaerob tetapi aerotoleran (untuk bentuk bulat dan batang) yang toleran terhadap asam dan memproduksi asam laktat sebagai produk akhir terbesar selama fermentasi gula (Axelsson, 2004). Walaupun demikian, pada kondisi tertentu beberapa BAL tidak menunjukkan semua karakteristik tersebut. Sehingga gambaran yang paling umum BAL adalah gram positif dan ketidakmampuan untuk mensintesa

gugus forfirin. Ketidakmampuan mensintesa forfirin (contohnya, heme) menyebabkan tidak terdapatnya katalase dan sitokrom dalam BAL (tanpa suplementasi heme dalam media pertumbuhan). Oleh karena itu, BAL tidak memiliki rantai transport elektron dan menggunakan fermentasi untuk menghasilkan energi.

BAL tidak dapat menggunakan oksigen dalam produksi energinya, sehingga BAL tumbuh pada kondisi yang anaerob, tetapi tetap dapat tumbuh dengan keberadaan oksigen. Mereka terlindung dari *oxygen by-product* (contohnya, H_2O_2) karena memiliki peroksidase. Karena BAL menghasilkan energi yang rendah, BAL tumbuh lebih lambat dibandingkan mikroba yang mampu melakukan respirasi, dan menghasilkan koloni yang kecil 2-3 mm. BAL dapat tumbuh pada suhu 5 – 45°C dan toleran terhadap kondisi asam, dengan sebagian besar strain mampu tumbuh pada pH 4,4. Pertumbuhannya optimum pada pH 5,5 – 6,5 dan membutuhkan nutrisi kompleks seperti asam amino, peptida, basa nukleotida, vitamin, mineral, asam lemak dan karbohidrat. Selain itu, BAL memproduksi sejumlah kecil senyawa organik yang memberikan aroma dan flavor pada produk hasil fermentasinya (Axelsson, 2004).

Genus BAL terbagi menjadi tiga kelompok berdasarkan pola fermentasinya (Gambar 1):

- a. Homofermentatif; menghasilkan lebih dari 85% asam laktat dari glukosa. BAL memfermentasi 1 mol glukosa menjadi 2 mol asam laktat, menghasilkan 2 mol ATP per molekul glukosa yang dimetabolisme. Asam laktat adalah produk utama fermentasi ini.
- b. Heterofermentatif; menghasilkan hanya 50% asam laktat. BAL ini memfermentasi 1 mol glukosa menjadi 1 mol asam laktat, 1 mol etanol dan 1 mol CO_2 . Satu mol

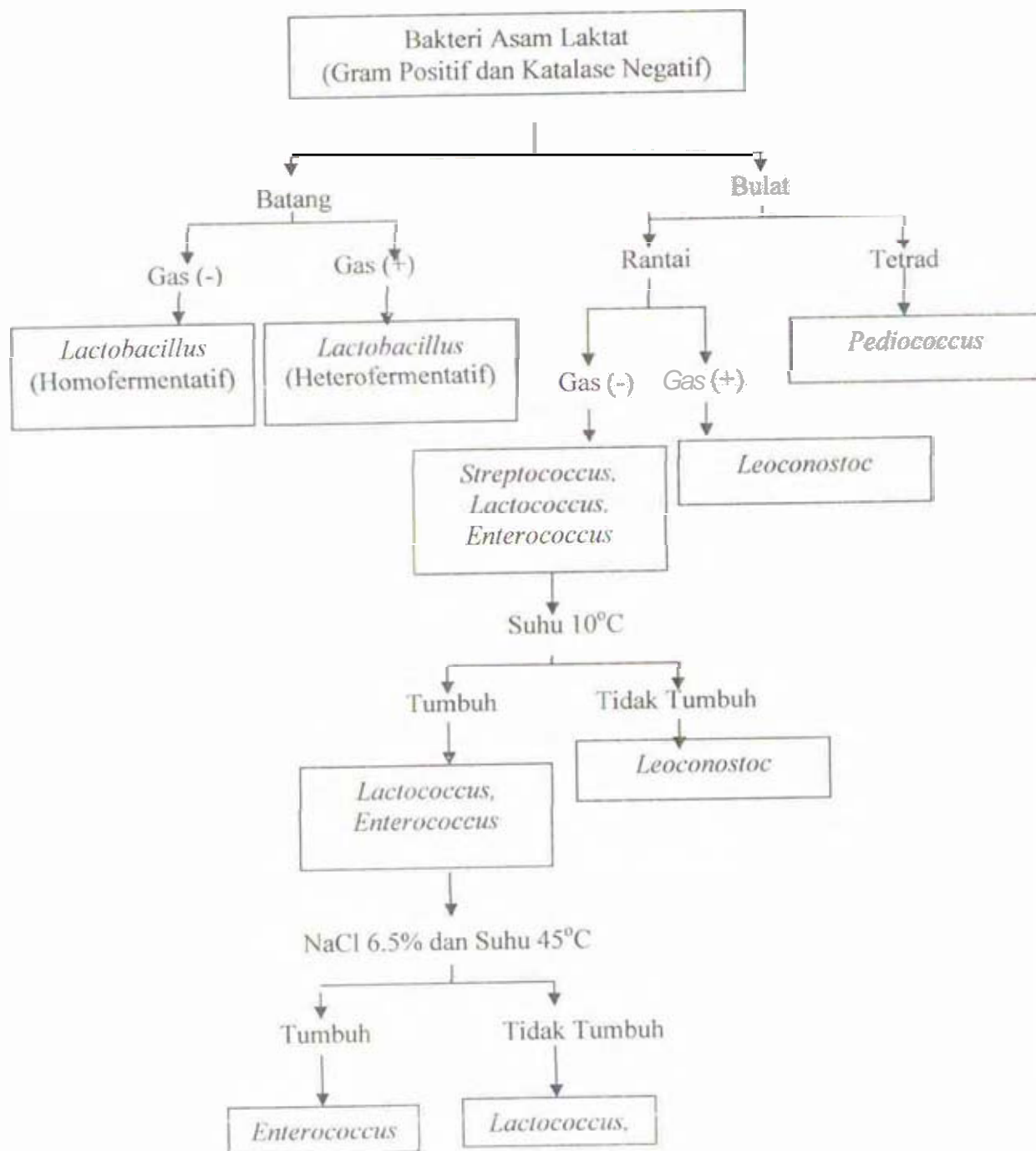
ATP dihasilkan dari satu mol glukosa, menghasilkan pertumbuhan yang lebih rendah per mol glukosa yang dimetabolisme.

- c. Kurang dikenal sebagai spesies heterofermentatif yang memproduksi DL-asam laktat, asam asetat dan karbondioksida.

Menurut Benson (2003), sistem nomenklatur bakteri dapat diidentifikasi dengan beberapa kategori :

1. **Morfologi** : Ukuran, bentuk, rangkaian sel, ada tidaknya spora, ada tidaknya flagella, kedudukan dan jumlah flagella serta ada tidaknya kapsula.
2. Karakteristik kebiasaan : Kondisi optimum untuk tumbuh (pH, suhu, dll)
3. Aktivitas biokimia : perubahan-perubahan karbohidrat, hidrolisa lemak, penguraian protein, reduksi bermacam-macam unsure dan pembentukan pigmen.
4. Karakteristik serological : reaksi dari sel dengan serum yang mengandung zat antibodi.

Sedangkan skema identifikasi bakteri asam laktat hingga level genus (Rahayu dkk, 1996) Gambar 3.



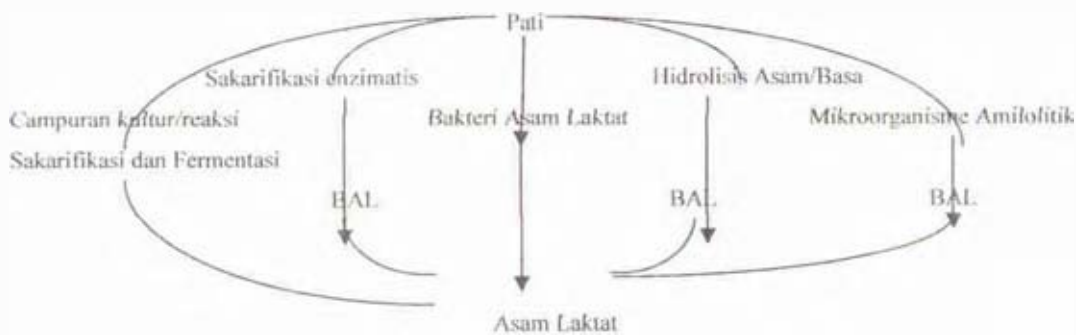
Gambar 2. Skemn Identifikasi Bakteri Asam Laktat Sampai Pada Level Genus (Rahayu dkk, 1996)

f.6. Bakteri Asam Laktat Amilolitik

Bakteri asam laktat amilolitik telah didapatkan dari berbagai makanan terfermentasi dari bahan berpati, terutama dari kasava dan sereal (jagung dan sorgum). Strain dari *Lactobacillus plantarum* telah diisolasi dari produk kasava terfermentasi yang berasal dari Afrika (Nwankwo *et al.*, 1989), dan spesies baru *Lactobacillus manihotivorans* (Morlon-Guyot *et al.*, 1998) yang diisolasi dari fermentasi pati kasava asam di Colombia. Olympia *et al.* (1995) melakukan karakterisasi strain amilolitik *L. plantarum* dari burong isda, makanan terfermentasi terbuat dari ikan dan beras di Filipina. Strain amilolitik *L. fermentum* juga telah diisolasi pertama kalinya dari adonan asam jagung Benin (ogi dan mawe) oleh Agati *et al.* (1998). Selanjutnya, Sanni *et al.* (2002) menjelaskan strain amilolitik *L. plantarum* dan *L. fermentum* pada berbagai makanan tradisional berbasis pati terfermentasi dari Nigeria. Pencarian BAL amilolitik dari makanan berpati yang terfermentasi didasarkan pada tingginya kandungan pati dari bahan bakunya.

Peran BAL telah dijelaskan, bahwa mono dan disakarida, seperti glukosa dan sukrosa, yang secara alami ada pada sereal dan kasava, telah tersedia untuk fermentasi asam laktat. Berbagai bentuk pengolahan bahan baku dapat menentukan komposisi mikrobiota dan, khususnya, keberadaan BAL amilolitik (Guyot *et al.*, 2000). BAL amilolitik telah berulang kali diisolasi dari makanan tradisional berbasis sereal dan kasava terfermentasi (Johansson *et al.*, 1995; Morlon *et al.*, 1998; Nwankwo *et al.*, 1989; Olympia *et al.*, 1995; Sanni *et al.*, 2002). Berdasarkan kemampuan α -amylase yang dimiliki untuk menghidrolisa pati secara parsial, BAL amilolitik dapat memfermentasi

berbagai macam bahan baku berpati, seperti jagung , (Nakamura, 1981), kentang atau kasava (Giraud *et al.*, 1994) dan substrat yang diperoleh dari bahan berpati lainnya (Naveena *et al.*, 2003 ; Vishnu *et al.*, 2002). BAL amilolitik dapat mengubah pati secara langsung menjadi asam laktat (Gambar 2). BAL amilolitik menggunakan biomassa berpati dan mengubahnya menjadi asam laktat dalam fermentasi langsung.



Gambar 3. Model skematik produksi asam laktat dari pati sebagai substratnya (Sumber : Reddy *et al.*, 2008)

Sebagian besar BAL amilolitik digunakan dalam fermentasi makanan. BAL amilolitik juga terlibat dalam makanan terfermentasi berbasis sereal, seperti roti Eropa dari aye asam, roti bergaram dari Asia. bubur asam dan produksi minuman non alkohol. Sebagian diantaranya digunakan untuk produksi asam laktat dengan fermentasi pati secara langsung atau dalam satu tahapan (*single step fermentation*) (Reddy *et al.*, 2008). Pengembangan untuk memproduksi strain yang memfermentasi pati menjadi asam laktat secara langsung (dengan satu tahapan), sangat penting untuk membuat proses menjadi lebih ekonomis.

Beberapa strain *Lactobacillus spp.* menghasilkan amilase ekstraseluler dan memfermentasi pati secara langsung menjadi asam laktat. Hal ini disebabkan karena

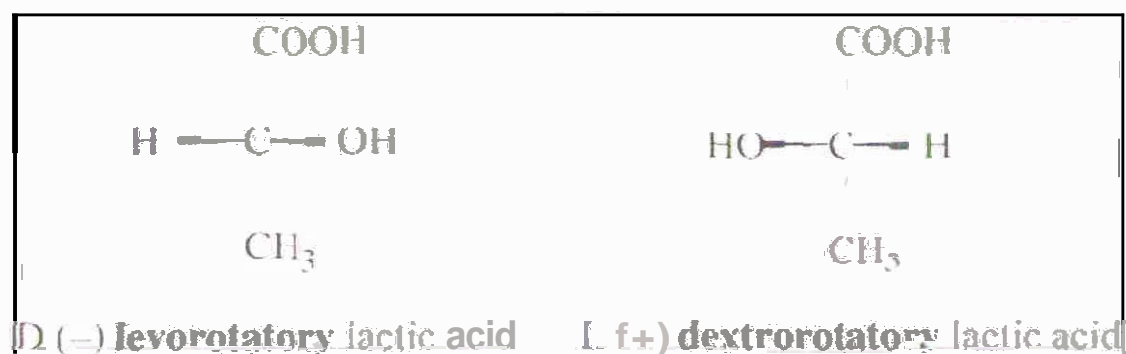
fermentasi dengan BAL amilolitik akan menggabungkan dua proses yaitu hidrolisis enzimatis substrat karbohidrat (pati) sekaligus fermentasi yang memanfaatkan gula yang dihasilkan menjadi asam laktat (Reddy *et al.*, 2008). Penelitian Calderon *et al.* (2001) pada *Lactobacillus fermentum strain Gi E1* menunjukkan bahwa pertumbuhan dan produksi amilase dari mikroba ini lebih tinggi dengan substrat maltosa dibandingkan dengan pati. Hal ini dapat dijelaskan bahwa efisiensi konversi pati dibatasi oleh akumulasi limit dekstrin yang tidak terfermentasi lebih lanjut, sehingga membatasi pertumbuhan dan sintesis amilase.

2.7. Asam laktat dan perannya terhadap perubahan karakteristik pati

Asam laktat ($C_3H_6O_3$) merupakan asam organik yang non-volatil, tidak berbau dan diklasifikasikan sebagai bahan yang aman digunakan sebagai bahan tambahan pangan (GRAS = Generally Recognized As Safe) oleh FDA (Food and Drug Administration). Merupakan produk proses fermentasi oleh bakteri asam laktat pada proses pembuatan mentega, keju, *hi*, adonan asam dan beberapa pangan fermentasi lainnya dan jenis asam yang pertama kali diproduksi secara bioteknologi. Secara luas asam laktat telah dimanfaatkan sebagai asidulan, pemberi flavor dan sebagai buffer pH atau penghambat pertumbuhan bakteri pembusuk pada berbagai makanan olahan, seperti permen, produk roti dan bakeri, minuman ringan, sup, olahan susu, selai dan jeli, mayonais, dan telur olahan, seringkali digabungkan dengan penggunaan asidulan lainnya (Datta *et al.*, 2006; Naveena, 2004).

Asam laktat terdiri atas tiga atom karbon dimana satu terminal atom karbon merupakan bagian asam atau gugus karboksil dan bagian ujung atom karbon lainnya mengandung metal atau gugus hidrokarbon. Asam laktat ada dalam dua bentuk

berdasarkan dua isomer optik aktif yaitu bentuk L (+) and the D (-) (Gambar 5). Asam laktat bersifat larut dalam air dan pelarut organik yang menyerupai air menunjukkan sifat volatile yang rendah, dengan suhu titik didih 122°C pada tekanan 14 mmHg. Asam laktat dapat dianalisa dengan menggunakan enzim laktat dehidrogenase yang berikatan dengan MAD (Nikotilamid adenine dinukleotida). Metode kolorimetri juga dapat digunakan untuk menentukan total asam laktat yang terkandung pada produk tertentu. Gas chromatography dapat digunakan setelah dilakukan esterifikasi asam laktat walaupun hasilnya tidak memuaskan. Kromatografi cair dapat digunakan dengan berbagai variasi teknis untuk analisis kuantitatif dan pemisahan isomer optiknya..



Gambar 4. Struktur isomer D dan L asam laktat (Sumber : Reddy *et al.*, 2008)

Produksi asam laktat dari bahan berpati dilakukan dengan melalui tahapan sakarifikasi yang selanjutnya dimanfaatkan oleh bakteri asam laktat sebagai substrat pada proses metabolismenya. Asam laktat juga dapat dihasilkan langsung dari pati dengan fermentasi menggunakan BAL yang memiliki kemampuan produksi amilase ekstraseluler (Petrov, et al., 2008).

Asam laktat dapat menyebabkan degradasi pati, mengubah struktur pati dan mengakibatkan perubahan karakteristik granula pati. Perlakuan asam dapat

memodifikasi granula tanpa menyebabkan perubahan yang substansial pada bentuk granula patinya (Gunaratne dan Corke, 2007). Molekul asam terutama menyerang bagian amorphous dan selanjutnya secara simultan menghidrolisis amilosa dan amilopektin.

Perendaman biji jagung dengan asam laktat mengakibatkan perubahan profil viskositas pati jagung dan menurunkan karakteristik *pasting*nya (Haros *et al.*, 2003), hal yang sama ditemukan pada pati kasava yang diberikan perlakuan asam laktat (Bertolini *et al.*, 2000). dan pada pati kasava setelah fermentasi asam (Numfor *et al.*, 1995). Tidak terdapatnya asam laktat pada suspensi pati menunjukkan bahwa degradasi oleh asam laktat mungkin terjadi di dalam kernel biji selama perendaman. Asam laktat mungkin berdifusi ke dalam granula pati selama hidrasi dan swelling, walaupun granula pati tidak larut dalam air dan tidak mengalami gelatinisasi (Haros *et al.*, 2003).

Asam laktat, seperti juga asam asetat dan asam sitrat juga mempengaruhi karakter gelatinisasi dari beras selama pemanasan dan pemasakan, meningkatkan absorpsi air oleh amilopektin pada pati beras. Suhu gelatinisasi dari beras yang dimasak dengan air terdistilasi, 0,05 M asam asetat dan 0,05 M asam laktat secara berturut-turut adalah 90, 87 dan 84°C. Kondisi tersebut dapat disebabkan karena granula pati menjadi lebih rapuh dan pecah lebih cepat setelah pengasaman. Granula pati hasil pengasaman yang selanjutnya diuji menunjukkan kondisi permukaan yang lebih halus, solid dan tidak porous, dibandingkan pati yang tidak diasamkan. Hal tersebut menunjukkan bahwa pati beras yang telah diasamkan tergelatinisasi lebih baik, sehingga ukuran pori-pori menjadi lebih kecil (Ghasemi *et al.*, 2008).

Pati kasava yang direndam dalam larutan 0,1 N KMnO₄ selanjutnya diberi perlakuan asam laktat 1% juga menunjukkan pengembangan granula yang lebih baik

(spesifik volume 18 ml/g) dibandingkan dengan pati kasava tanpa perendaman (3.2 ml/g), pati kasava asam komersial (10 ml/g) atau pati kasava yang direndam dengan asam sitrat (14,6 ml/g) (Demiate *et al.*, 2000).

Pati kasava yang difermentasi secara alami mengandung asam laktat, asam asetat, asam butirat dan asam propionat (dimana asam laktat terdapat dalam jumlah yang lebih besar), menunjukkan adanya perubahan pada permukaan granula yang menunjukkan adanya penyerangan oleh asam. Peningkatan porositas yang terjadi pada granula pati selama fermentasi diduga merupakan efek dari peningkatan asam selama fermentasi dan juga adanya aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh mikroorganisma yang berperan selama proses fermentasi tersebut (Marcon *et al.*, 2006).

2.8. Pengeringan matahari dan iradiasi UV

Tahap-tahap fermentasi pati kasava dan pengeringan matahari diperlukan untuk mendapatkan ciri pengembangan tapioka asam. Pengeringan pati kasava setelah tahap fermentasi, dengan menggunakan oven pada suhu 40°C dan lama 8 jam yang mirip dengan kondisi pengeringan matahari, tidak menghasilkan pati yang mengembang pada *baking* (Metres *et al.*, 1997).

Modifikasi tapioka karena keberadaan asam laktat di dalamnya bersama dengan pengeringan matahari, terbukti meningkatkan volume spesifik biskuit yang dibuat dari tapioka termodifikasi tersebut, tetapi tidak terjadi jika digunakan pati hasil pengeringan dengan oven (Plata-Oviedo dan Camargo, 1998). Fenomena ini mungkin karena akibat gabungan reaksi-reaksi asam laktat dan penyinaran UV matahari pada pati kasava dengan akibat degradasi pati yang berkaitan dengan kemampuan pati untuk

mengembang pada *baking* (Bertolini *et al.*, 2000; Bertolini *et al.*, 2001). Fermentasi pati jagung dan pengeringan matahari, tidak berakibat menjadikan pati jagung mengembang pada *baking* (Bertolini *et al.*, 2000).

Tapioka yang diasamkan dengan penambahan asam laktat dan disinari dengan lampu merkuri pada panjang gelombang 250-600 nm, berpengaruh nyata terhadap kemampuan pengembangan (Bertolini *et al.*, 2000). Penemuan ini menegaskan bahwa baik tapioka asam maupun tapioka yang diberi asam laktat dan disinari UV, mengakibatkan degradasi yang ditunjukkan oleh penurunan viskositas berdasar pengukuran menggunakan viskosimeter, dan penurunan viskositas akhir yang sangat besar berdasar pengukuran dengan Rapid Visco Analyzer (Bertolini *et al.*, 2000; Caramo *et al.*, 1988), seperti ciri pati kasava asam seperti (Metres *et al.*, 1997).

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

31. Tujuan Penelitian

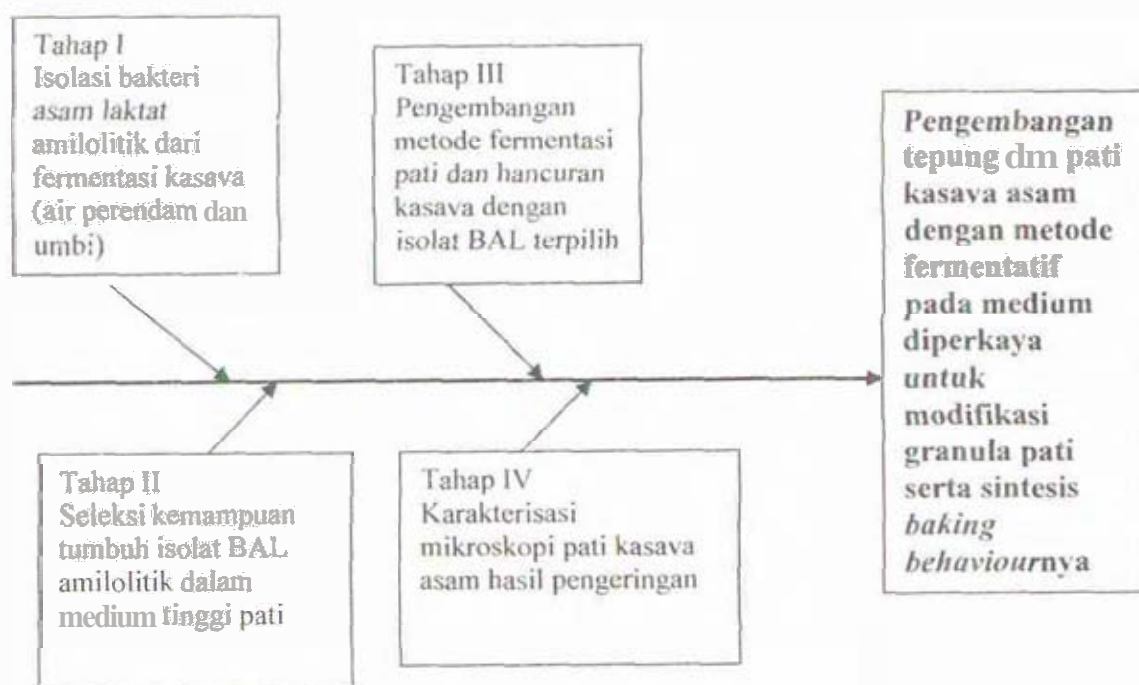
Tujuan penelitian ini adalah melakukan seleksi bakteri asam laktat hasil isolasi dan mengkaji peran bakteri asam laktat terpilih terhadap perubahan granula pati kasava pada berbagai kondisi fermentasi. Seleksi jenis bakteri asam laktat didasarkan kemampuan tumbuh pada media kasava. Selanjutnya strain terpilih dikaji perannya dalam memodifikasi mikrostruktur pati kasava dengan menganalisis perubahan karakteristik granula patinya yang meliputi kemampuan pengembangannya selama *baking* dan karakteristik mikroskopi dengan Scanning Electron Microscopy (SEM).

32. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan oleh industri produsen pati kasava sehingga dapat menghasilkan pati yang dapat dimanfaatkan untuk produk makanan ringan dan bakery sehingga mengurangi ketergantungan pada tepung terigu yang bahan bakunya impor.

BAB IV. METODE PENELITIAN

Penelitian ini disusun secara bertahap di mana setiap tahapannya merupakan tindak lanjut dari tahap yang sebelumnya. Dengan mempertimbangkan distribusi waktu dan sumber daya, maka penelitian ini dibagi berdasarkan waktu pelaksanaan penelitian (Gambar 4).



Gambar 5. Fishbone penelitian secara keseluruhan

4.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Laboratorium Bioteknologi Pangan Jurusan Teknologi Pangan Hasil Pertanian, Fakultas

Teknologi Pertanian – Unibraw Malang mulai bulan Agustus 2009 sampai bulan November 2009.

4.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah pati singkong terfermentasi (IRT Bapak Sadikin, Pati – Jawa Tengah), medium MRS merk Merck (*Mann Rogosa Starch*) (tab. Mikrobiologi THP UB), Agar (Lab. Mikrobiologi THP UB), Pepton (Lab. Mikrobiologi THP UB), Aquades (Panadia dan Lab. Kimia UB), Alkohol (Medilab), Spirtus (Panadia), *Beff Ekstrak* (Lab. Mikrobiologi THP UB, Plastik Stomacher (Lab. Mikrobiologi THP UB), dan Natrium Asida (Lab. Biokimia THP UB).

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan untuk analisa dalam bentuk p.a adalah Etanol, Aceton, Iodine, Soluble Starch, Hidrogen Peroksida CaCO_3 , dan Safranin. Untuk bahan-bahan yang digunakan sebagai analisa dalam bentuk teknis adalah Violet Kristal (Lab. Biokimia THP UB).

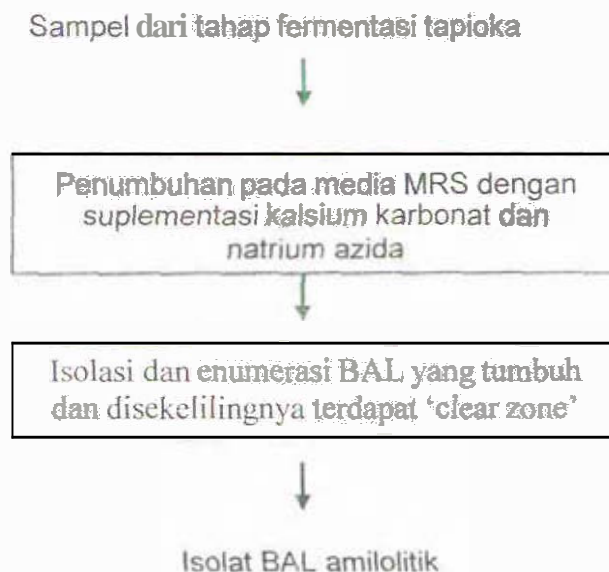
Peralatan yang digunakan untuk penelitian ini adalah Stomecher (merk Seward BA 7020), Laminer Air Mow, Inkubator (merk Binder BD 53 Jerman dan Barnstead Lab-line), Tabung reaksi (merk Pyrex), cawan @ (merk Pyrex), microtube, micropipette 1 ml, micropipette 10µml, yellow tip, blue tip, autoclave (merk HL-36 AE Hiramaya Jepang), glass.ware (merk Pyrex), sptula, timbangan digital (merk Mettler Toledo), ose, kompor listrik, hot plate, stirrer, api Bunsen, mikroskop (merk Olympus), Spektrofotometer (merk Jenway 6305), pH meter, kulkas (merk LG) dan Sentrifuse dingin (merk Mikro 22R Hettich).

4.3. Metodologi Penelitian

Penelitian ini bersifat eksploratif/diskriptif dan dilakukan dalam empat tahap sebagai berikut :

Tahap 1. Isolasi bakteri asam laktat (BAL) amilolitik dari fermentasi kasava

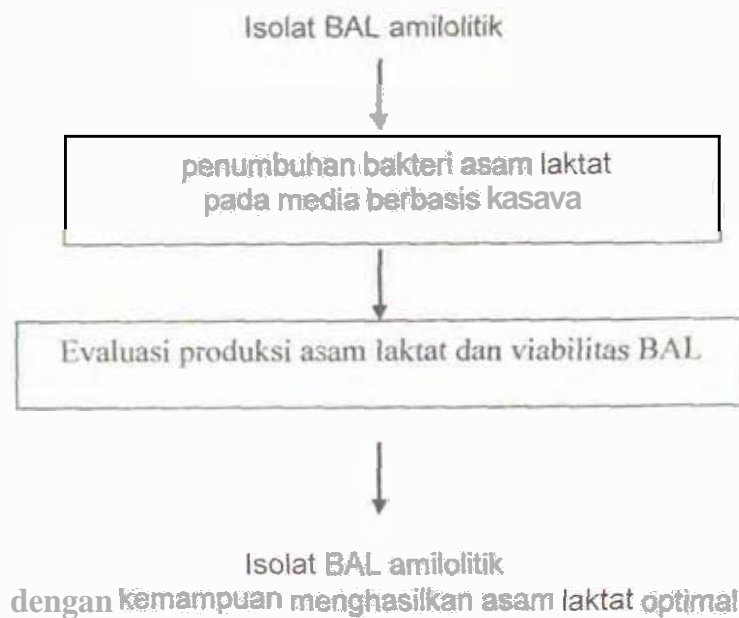
Sampel untuk isolasi diambil dari tahap fermentasi kasava pada industri growol dan industri ~~tapioca~~. Kemudian dari masing-masing batch diambil sampel secara acak, untuk isolasi dan enumerasi BAL. Isolasi dan enumerasi dilakukan dengan metode *dilution plating* dalam medium MRS agar yang ditambahkan kalsium karbonat. Setelah dilakukan pemurnian, isolat akan disimpan pada suhu -40°C . Isolat bakteri asam laktat yang diperoleh selanjutnya akan diidentifikasi dengan melihat sifat-sifat morfologi dan fisiologisnya seperti bentuk dan ukuran sel, reaksi Gram, uji katalase dan uji sifat amilolitiknya. Uji biokimiawi akan menggunakan API50. Berdasar pada karakter isolat akan diidentifikasi spesiesnya.



Gambar 6. Diagram alir penelitian isolasi bakteri asam laktat

Tahap II. Seleksi isolat BAL amilolitik dalam degradasi medium berbasis pati

Isolat hasil isolasi pada tahap pertama diuji kemampuannya tumbuh pada medium berbasis pati secara kualitatif maupun kuantitatif. Uji secara kualitatif dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada medium starch-agar untuk mengetahui kemampuan tumbuhnya. .



Gambar 7. Diagram alir penelitian uji potensi isolat bakteri asam laktat

Tahap III. Pengembangan metode fermentasi pati dan hancuran kasava

Fermentasi pati kasava tradisional mempunyai ciri berlangsung lambat. Proses fermentasi bisa berlangsung selama beberapa hari untuk mencapai tujuan yang diinginkan. Hal tersebut kemungkinan besar disebabkan nutrisi kasava tidak cukup untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Pada penelitian ini akan dilakukan studi tentang penambahan nutrisi ke dalam media fermentasi kasava agar proses fermentasi

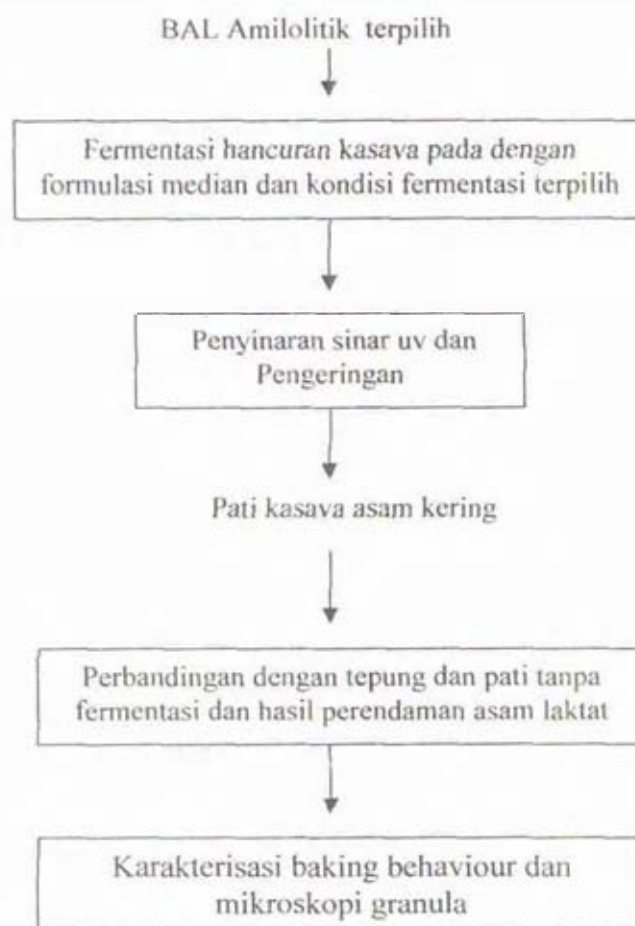
berlangsung lebih cepat. Dalam medium fermentasi ditambahkan sumber nitrogen, yaitu pepton, yeast ekstrak, pada berbagai konsentrasi. Jumlah penambahan dipilih pada konsentrasi yang optimum, yaitu pada konsentrasi yang mulai menyebabkan saturasi laju pertumbuhannya. Selanjutnya masing-masing isolat bakteri asam laktat ditumbuhkan pada medium pati dan hancuran kasava yang telah diperkaya. Pada tahap fermentasi juga akan dicari tingkat penggunaan inokulum dan waktu fermentasi yang optimum. Tingkat inokulasi yang akan dipelajari adalah $10^4 - 10^7$ sel/ml. Selama waktu fermentasi akan diamati laju pertumbuhan sel, penurunan pH dan produksi asam laktat. Selanjutnya pati atau hancuran kasava terfermentasi dikeringkan dengan sinar matahari sampai kering, digiling dan dilihat sifat mengembangnya pada saat *baking*.



Gambar 8. Pengembangan metode fermentatif dengan medium diperkaya

Tahap IV. Karakterisasi tepung dan pati kasava asam

BAL amilolitik terpilih selanjutnya akan digunakan pada tahapan fermentasi untuk menghasilkan pati kasava. Pati kasava asam yang dihasilkan akan dibandingkan karakteristiknya pati kasava tanpa fermentasi dan hasil perendaman dengan asam laktat. Karakterisasi pada tahapan ini meliputi analisis karakteristik warna (Mestres *et al.*, 1997), analisis karakteristik mikroskopi menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM), pH dan karakteristik pengembangan pati. (Demiante *et al.*, 2000).



Gambar 9. Karakterisasi tepung dan pati kasava asam

4.4 Pelaksanaan Penelitian

4.4.1 Proses Pengambilan Sampel

Bahan baku pati singkong terfermentasi didapatkan dari Industri Rumah tan — Bapak Sadikin Pati – Jawa Tengah. Pati terfermentasi tersebut diambil pada proses fermentasi selama 5 hari dan 10 hari.

4.4.2 Isolasi Bakteri Asam Laktat Amilolitik

1. Bahan baku pati terfermentasi dilarutkan dengan menggunakan pepton dengan perbandingan 5gr : 45 ml pada stomacher.
2. Larutan kemudian diencerkan sampai dengan pengenceran 10^{-3}
3. Untuk pengenceran 10^{-4} sampai dengan 10^{-6} diinokulasikan pada media MRSA dengan menggunakan teknik pour plate dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam.
4. Isolat terpilih kemudian diinokulasikan pada media MRSB dan diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam.
5. Isolat yang sudah diinkubasikan tersebut akan dimurnikan menggunakan teknik goresan kuadran pada media MRSA untuk mendapatkan kultur/biakan murni.
6. Kultur murni tersebut diinokulasikan pada media MRSB dan diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam.
7. Pada 24 jam pertama kultur murni tersebut diambil $10\mu\text{l}$ dengan menggunakan micropipette $10\mu\text{l}$ dan dengan menggunakan yellow tip untuk kemudian dilakukan pengujian pewarnaan gram dan katalase.
8. Pada 48 jam masa inkubasi, kultur murni tersebut diambil $10\mu\text{l}$ dengan menggunakan micropipette $10\mu\text{l}$ dan dengan menggunakan yellow tip untuk kemudian dilakukan

pengujian sifat amilolitik dengan diinokulasikan pada medium *starch agar* kemudian diinkubasi pada incubator dengan suhu 37°C selama 48 jam.

9. Setelah dinkubasi selama 48 jam, media pertumbuhan *starch agar* kemudian ditetesi dengan menggunakan larutan iodine untuk menentukan sifat amilolitiknya.

4.43 Identifikasi Isolat Terpilih

1. Isolat terpilih kemudian diidentifikasi menggunakan API 50 CH Strip dan API CHL medium.
2. Isolat tersebut inokulasikan pada medium API CHL dan divortek.
3. Kemudian medium API CHL yang telah berisi inokulum dimasukkan kedalam API 50 CH Strip yang berisi 50 jenis karbon yang berbeda untuk dilakukan uji.
4. API 50 CH Strip kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam dan diamati perubahan warna yang terjadi.
5. Hasil dari uji tersebut kemudian akan dimasukkan dala APIWEB untuk dapat melihat hasilnya.

4.4.4 Karakterisasi Isolat Terpilih

Isolat terpilih kemudian dilakukan karakterisasi meliputi penumbuhan isolat pada suhu, pH, kadar NaCl yang berbeda serta kemampuannya dalam menghidrolisis pati.

a Suhu (F. Reque 1999 dengan modifikasi)

1. Isolat terpilih diinokulasikan pada media MRSB kemudian ditumbuhkan pada suhu yang berbeda yaitu 10°C, 37°C, dan 45°C lalu diinkubasikan selama 48 jam.
2. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 600nm pada waktu tumbuh 0 jam, 24 jam dan 48 jam.

b. pH (Cappuccino and Sherman, 2005 dengan modifikasi)

1. Isolat terpilih diinokulasikan pada media MRSB kemudian ditumbuhkan pada pH yang berbeda yaitu pH 4, pH 6, dan pH 8 lalu diinkubasikan selama 48 jam,
2. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan *Spektrofotometer* dengan panjang gelombang 600nm pada waktu tumbuh 0 jam, 24 jam dan 48 jam.

c. NaCl (Cappuccino and Sherman., 2005 dengan modifikasi)

1. Isolat terpilih diinokulasikan pada media MRSB kemudian ditumbuhkan pada kadar NaCl yang berbeda yaitu 0.5%, 2%, dan 3.5% lalu diinkubasikan selama 48 jam.
2. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan *Spektrofotometer* dengan panjang gelombang 600nm pada waktu tumbuh 0 jam, 24 jam dan 48 jam.

d. Hidrolisis Pati

1. Isolat terpilih yang berumur 24 jam diinokulasikan pada media *Starch Broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada inkubator pada suhu 37°C.
2. Diambil 1 ml suspensi media menggunakan blue tip dan mikropipet 1 ml dan dimasukkan kedalam mikrotube.
3. Disentrifuse dingin dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 3°C selama 10 menit.
4. Supernatan yang ada pada mikrotube kemudian diambil dan diencerkan dengan aquades sampai 100 ml.
5. Diambil larutan hasil pengenceran tadi sebanyak 10 ml kemudian ditetaskan iodine 1 ml kemudian ditera pada *Spektrofotometer* pada panjang gelombang 590nm.

4.5 Analisa Isolat Murni

Untuk dapat menentukan isolat terpilih yang nantinya akan dikarakterisasi dan diidentifikasi, maka isolat murni sebelumnya harus dilakukan uji terlebih dahulu untuk dapat memastikan bahwa isolat murni yang telah didapat adalah isolat Bakteri Asam Laktat dengan sifat amilolitik.

Uji yang dilakukan antara lain :

- a. Uji Pewarnaan Gram untuk melihat apakah isolat murni yang telah didapat memiliki sifat gram positif atau gram negative. Hal tersebut digunakan untuk membedakan isolat murni yang telah didapat tergolong bakteri asam laktat atau tidak. Jika isolat murni tersebut tergolong bakteri asam laktat, maka pada uji ini isolat murni harus bersifat gram positif karena sifat dari bakteri asam laktat adalah termasuk ke dalam gram positif.
- b. Uji katalase untuk melihat apakah isolat murni yang telah didapat memiliki sifat katalase positif atau katalase negative. Hal tersebut digunakan untuk membedakan isolat murni yang telah didapat tergolong bakteri asam laktat atau tidak. Jika isolat murni tersebut tergolong bakteri asam laktat, maka pada uji ini isolat murni harus bersifat katalase negatif karena sifat dari bakteri asam laktat adalah termasuk ke dalam katalase negative.
- c. Uji Amilolitik untuk melihat apakah isolat murni yang didapat memiliki sifat amilolitik. Uji ini dilakukan dengan menginokulasikan isolat murni yang telah didapat pada media pati dan diinkubasikan selama 48 jam. Untuk melihat apakah senyawa pati tersebut hidrolisis atau tidak maka ditambahkan larutan iodine

sebagai indikator. Larutan iodine ini bisa berikatan pada struktur helix pati dan membentuk kompleks warna biru.

4.6 Analisa Data

Data hasil penelitian akan dianalisa secara deskriptif/eksploratif dengan cara membandingkan menggunakan literature yang telah ada untuk dapat menyimpulkan hasil dari penelitian tersebut.

Tabel 1. Indikator Kinerja untuk Setiap Kegiatan

Kegiatan	Indikator Kinerja
Isolasi bakteri asam laktat amilolitik dari tahap fermentasi kasava	▪ Isolat bakteri asam laktat dari bak fermentasi pembuatan growol
Uji kemampuan <i>Lactobacillus</i> sp mengurai glikosida sianogenik terlarut dan produksi asam laktat pada jus kasava dengan atau tanpa inaktivasi glikosidase	▪ Isolat dengan kemampuan mengurai glikosida sianogenik dan penghasil asam laktat.
Pengembangan metode fermentatif pada hancuran kasava dan pati kasava	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Metode fermentasi untuk memperoleh tepung kasava yang lebih mengembang pada saat <i>baking</i> ▪ Medium diperkaya yang dapat mempercepat fermentasi
Karakterisasi tepung dan pati kasava terfermentasi hasil pengeringan dengan sinar uv	▪ Karakter tepung dan pati kasava asam hasil pengeringan

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Isolasi bakteri asam laktat amilolitik dari fermentasi kasava

Mikroorganisma yang tumbuh selama fermentasi kasava bersukses sesuai dengan kondisi lingkungan tempat hidupnya, termasuk pula bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat yang bersifat amilolitik akan tumbuh pada substrat yang tinggi kandungan patinya atau sumber karbon utamanya adalah pati. Isolasi BAL pada fermentasi kasava diharapkan akan memperoleh BAL *indigeneous* yang memiliki kemampuan tumbuh cepat pada media yang sama dan bersifat amilolitik. Hasil isolasi BAL amilolitik pada fermentasi kasava pada pembuatan growol tidak memperoleh isolat yang potensial dalam degradasi pati karena uji kualitatif menggunakan media *starch-agar* tidak menghasilkan zona jernih yang jelas. Sedangkan beberapa isolat yang diperoleh dari fermentasi pati dari industri pati rakyat memiliki karakter amilolitik yang lebih jelas. Oleh sebab itu isolat hasil isolasi dari pati kasava terfermentasi yang dilaporkan pada penelitian ini.

Selama fermentasi pati kasava sumber karbon yang dapat dimanfaatkan oleh mikrobia terutama adalah dari pati, itulah sebabnya terdapat beberapa isolat dengan karakter amilolitik. Isolat non amilolitik akan sulit tumbuh atau hanya tumbuh bila sebagian pati telah didegradasi menjadi gula, sedangkan isolat dengan karakter amilolitik yang lemah akan tumbuh lebih lambat. Tabel 2 menunjukkan bahwa pada fermentasi pati selama 5 hari masih terdapat bakteri yang bukan BAL dan BAL yang mampu tumbuh dan memiliki karakter amilolitik walaupun lemah.

Tabel 2. Karakteristik isolat hasil isolasi dari fermentasi pati kasava selama 5 hari

Isolat Fermentasi 5 Hari	Gram (+/-)	Katalase (+/-)	Amilolitik (+/-)	Morfologi
A1	+	-	-	Batang pendek
A2	+	-	-	Batang sgt pendek
B1	+	-	-	Batang pendek
B2	+	-	-	Batang pendek
B3	+	-	-	Batang pendek
B4	+	-	-	Batang sgt pendek
B5	+	-	-	Batang pendek
B6	-	-	+	Batang panjang
B7	+	-	-	Batang sgt pendek
B8	+	-	+	Batang sgt pendek
B9	+	-	-	Batang pendek
B10	+	-	+	Batang pendek
B11	-	-	+	Batang sgt pendek
B12	+	-	-	Batang pendek
B13	+	-	-	Batang pendek
B14	+	-	+	Batang pendek
B15	-	-	+	Batang sgt pendek
B16	+	-	-	Batang pendek
B17	+	-	-	Batang pendek
B18	+	-	-	Batang pendek

3. Karakteristik isolat hasil isolasi dari fermentasi pati kasava selama 10 hari

Isolat Fermentasi 10 Hari	(+/-)	Katalase (+/-)	Amilolitik (+/-)	Morfologi
A1	+	-	-	Batang sedang
A2	+	-	-	Batang pendek
A3	+	-	-	Batang pendek
A4	f	-	++	Batang pendek
A5	+	-	-	Batang pendek
A6	+	-	-	Batang pendek
A7	+	-	-	Batang panjang
A8	+	-	-	Batang pendek
B1	+	-	++	Batang pendek
B2	+	-	-	Batang pendek
B3	+	-	-	Batang pendek
B4	+	-	-	Batang sgt pendek
B5	+	-	-	Batang pendek
B6	+	-	-	Batang pendek
B7	+	-	-	Batang pendek
B8	+	-	-	Batang pendek
B9	+	-	++	Batang sgt pendek

Keterangan : + menunjukkan karakter positif, ++ menunjukkan karakter positif yang lebih jelas

Tabel 2 dan 3 menunjukkan bahwa BAL hasil isolasi didominasi isolat dengan bentuk batang (*Lactobacillus*). Karakteristik BAL adalah gram positif, tidak membentuk spora, katalase negative, an d tetapi aerotoleran (untuk bentuk bulat dan batang) yang toleran terhadap asam dan memproduksi asam laktat sebagai produk akhir terbesar selama fermentasi gula (Axelsson, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Guyot and Marton-Guyot (2001), Morlon-Guyot *et al.* (1998), Lacerda *et al.* (2005) dan Sanni *et al.* (2002) dengan sampel makanan tradisional berbasis pati terfermentasi, juga menghasilkan hal yang sama. Guyot dan Morlon-Guyot (2001) menyatakan bahwa selama ekstraksi pati secara basah pada prosesing kasava terjadi pembuangan gula-gula. Pada kondisi ini bersama dengan produksi CO₂ merupakan kondisi yang cocok untuk sintesis amilase oleh BAL meskipun demikian agaknya sangat terbatas karena kandungan sumber nitrogen dalam kasava.

Isolat BAL yang diperoleh dari fermentasi pati yang lebih lama semakin besar karakter amilolitiknya (Tabel 33, hal ini dimungkinkan karena lebih besarnya sintesis amilase yang terjadi. Seperti pernyataan Axelsson *et al.* (2004), semakin lama pertumbuhan BAL semakin banyak glukosa yang dibutuhkan untuk proses glikolisis sehingga bakteri tersebut berusaha memproduksi amilase yang lebih banyak untuk mendegradasi pati menjadi glukosa yang dimanfaatkan lebih lanjut untuk proses metabolismenya dalam menghasilkan energi. Reddy *et al.* (2008) juga menyatakan, bahwa beberapa spesies BAL menghasilkan amilase ekstraseluler dan memfermentasi pati secara langsung menjadi asam laktat. Hal ini disebabkan karena fermentasi dengan BAL amilolitik akan menggabungkan dua proses yaitu hidrolisis enzimatis substrat karbohidrat (pati) sekaligus fermentasi yang memanfaatkan gula yang dihasilkan

menjadi asam laktat dan

Ketiga isolat yang diperoleh dari fermentasi pati kasava selama 10 hari diidentifikasi lebih lanjut untuk mengetahui apakah semuanya berasal dari spesies yang sama atau tidak, identitas isolat tersebut juga dibandingkan dengan isolat koleksi yang sudah diketahui spesiesnya yaitu *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum*, yang diperoleh dari Food and Nutrition Culture Collection, PAU Pangan dan Gizi, UGM. Hasil identifikasi dengan kit API 50 CHL strip yang terdiri dari 49 jenis karbohidrat adalah pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Identifikasi Isolat Amilolitik dengan kit API 50 CHL

Kode Isolat	Hasil identifikasi	Keterangan
A4	<i>Lactobacillus fermentum</i> 2	99,6 % good identification
B1	<i>Lactobacillus fermentum</i> 1	99,9 % excellent identification
B9	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99,8 % excellent identification
Type culture 1	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99,8 % excellent identification
Type culture 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> 2	99,8 % excellent identification

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ketiga isolat yang diperoleh merupakan dua spesies yang berbeda. Akan tetapi terdapat kemungkinan *Lactobacillus fermentum* 1 dan *Lactobacillus fermentum* 2 adalah spesies yang sama dengan strain yang berbeda, oleh sebab itu ketiga isolat ini akan diuji lebih lanjut untuk mengetahui apakah isolat tersebut berbeda satu dengan yang lain dan dengan isolat *type culture* yang telah ditemukan sebelumnya.

52. Seleksi isolat BAL amilolitik dalam degradasi medium berbasis pati

Kemampuan isolat dalam degradasi pati sangat menentukan kemampuan tumbuhnya pada medium berbasis pati dan produksi asam laktat. Oleh sebab itu **kelima isolat** yang teridentifikasi diseleksi lebih lanjut untuk mengetahui isolat yang paling potensial, yang nantinya akan digunakan sebagai inokulum dalam fermentasi pati untuk menghasilkan pati yang mengembang saat pemanggangan. Hasil seleksi ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Karakteristik pertumbuhan isolat pada pH rendah

Sampel	pH 3 (OD absorbansi pada 600 nm)		
	0 jam	24 jam	48 jam
A4	0,011	0,538	0,603
B1	0,034	0,366	0,524
B9	0,026	0,068	0,152
L. plantarum	0,03	0,345	1,004
L. fermentum	0,016	0,469	1,337

Sampel	pH 4 (OD absorbansi pada 600 nm)		
	0 jam	24 jam	48 jam
A4	0,007	1,838	3,605
B1	0,01	1,897	3,305
B9	0,009	1,854	3,74
L. plantarum	0,001	4,72	5,124
L. fermentum	0,006	5,02	5,012

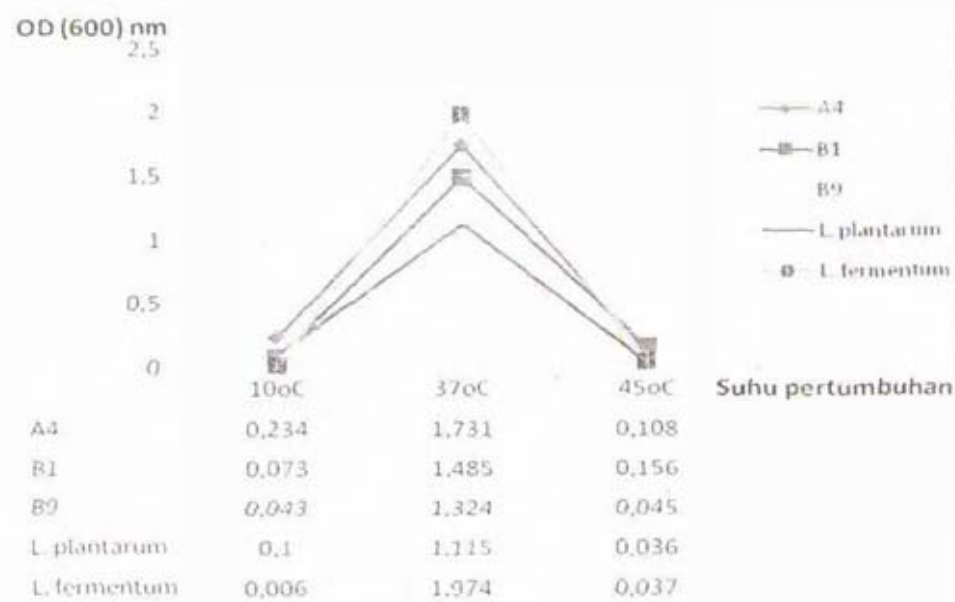
Sampel	pH 5 (OD absorbansi pada 600 nm)		
	0 jam	24 jam	48 jam
A4	0,015	1,983	4,995
B1	0,012	1,961	4,737
B9	0,016	6,035	6,364
L. plantarum	0,005	6,798	8,583
L. fermentum	0,008	7,003	8,318

Seleksi kemampuan tumbuh isolat pada kondisi media yang asam diperlukan untuk mengetahui isolat yang tahan pada kondisi pH rendah, karakteristik ini akan sangat bermanfaat untuk aplikasi isolat tersebut sebagai inokulum pada pembuatan berbagai produk terfermentasi terutama yang bertujuan untuk menghasilkan asam laktat. Pada pembuatan pati kasava asam, asam laktat merupakan komponen penting yang dapat menyebabkan degradasi pati, mengubah struktur pati dan mengakibatkan perubahan karakteristik granula pati. Perlakuan asam dapat memodifikasi granula tanpa menyebabkan perubahan yang substansial pada bentuk granula patinya (Gunaratne dan Corke, 2007).

Isolat yang tahan pH rendah akan tetap dapat tumbuh dengan baik dan menghasilkan produk metabolit asam organik walaupun isolat tersebut tidak dipisahkan dari mediumnya. Isolat A4 merupakan isolat yang lebih tahan pH rendah (pada pengamatan jam ke-24) daripada isolat yang lainnya, sedangkan isolat type culture *L.plantarum* dan *L.fermentum* tetap mampu tumbuh pada inkubasi jam ke-48 pada suhu rendah. Perbedaan kemampuan ini kemungkinan disebabkan karena isolat type culture diisolasi dari medium yang asam sehingga ketahanan pada pH asam lebih baik. Kelima isolat rata-rata mampu tumbuh pada pH 4 dan 5.

Isolat yang akan digunakan sebagai inokulum pada suatu proses fermentasi juga diinginkan memiliki kemampuan tumbuh pada range suhu yang berbeda, hal ini dapat bermanfaat untuk mengantisipasi perubahan suhu selama proses fermentasi berlangsung atau dalam usaha untuk mempercepat atau memperlambat proses. Kelima isolat memiliki kemampuan yang berbeda selama ditumbuhkan pada suhu 10, 37 dan 45°C.

Semua isolat mampu tumbuh baik pada suhu 37°C yang adalah memang suhu optimal bagi pertumbuhan berbagai jenis BAL. Axélsson (2004) menyatakan bahwa „BAL dapat tumbuh pada suhu 5 – 45°C dan toleran terhadap kondisi asam, dengan sebagian besar strain mampu tumbuh pada pH 4,4. Pertumbuhannya optimum pada pH 5,5 – 6,5 dan membutuhkan nutrisi kompleks seperti asam amino, peptida, basa nukleotida, vitamin, mineral, asam lemak dan karbohidrat.



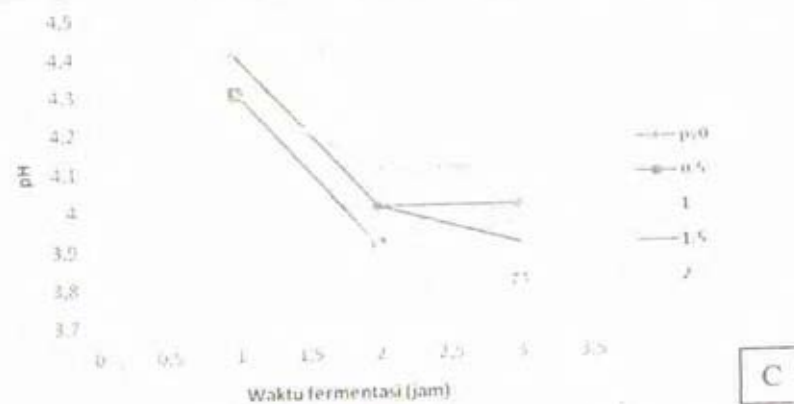
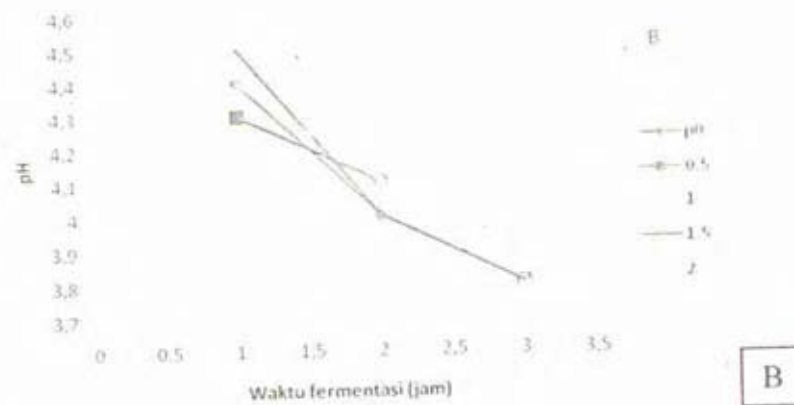
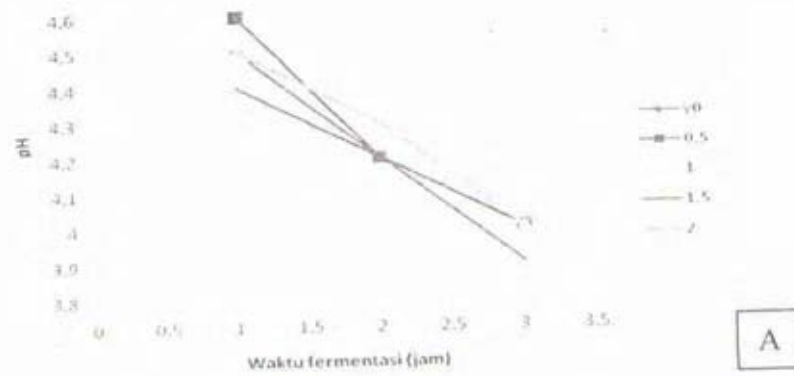
Gambar 10. Kemampuan tumbuh lima isolat BAL pada berbagai suhu.

Isolat A4 tumbuh lebih baik pada suhu 10°C dibandingkan dengan isolat lainnya, sedangkan pada suhu 45°C isolat B1 tumbuh lebih baik walaupun tidak berbeda nyata dengan isolat A4 (Gambar 10). Isolat A4 merupakan isolat hasil isolasi dari pati kasava dengan kemampuan tumbuh yang terbaik pada pH rendah dan suhu rendah, kemampuannya ini menyebabkan isolate A4 paling potensial digunakan untuk memfermentasi pati kasava.

4.3. Pengembangan metode fermentasi pati kasava

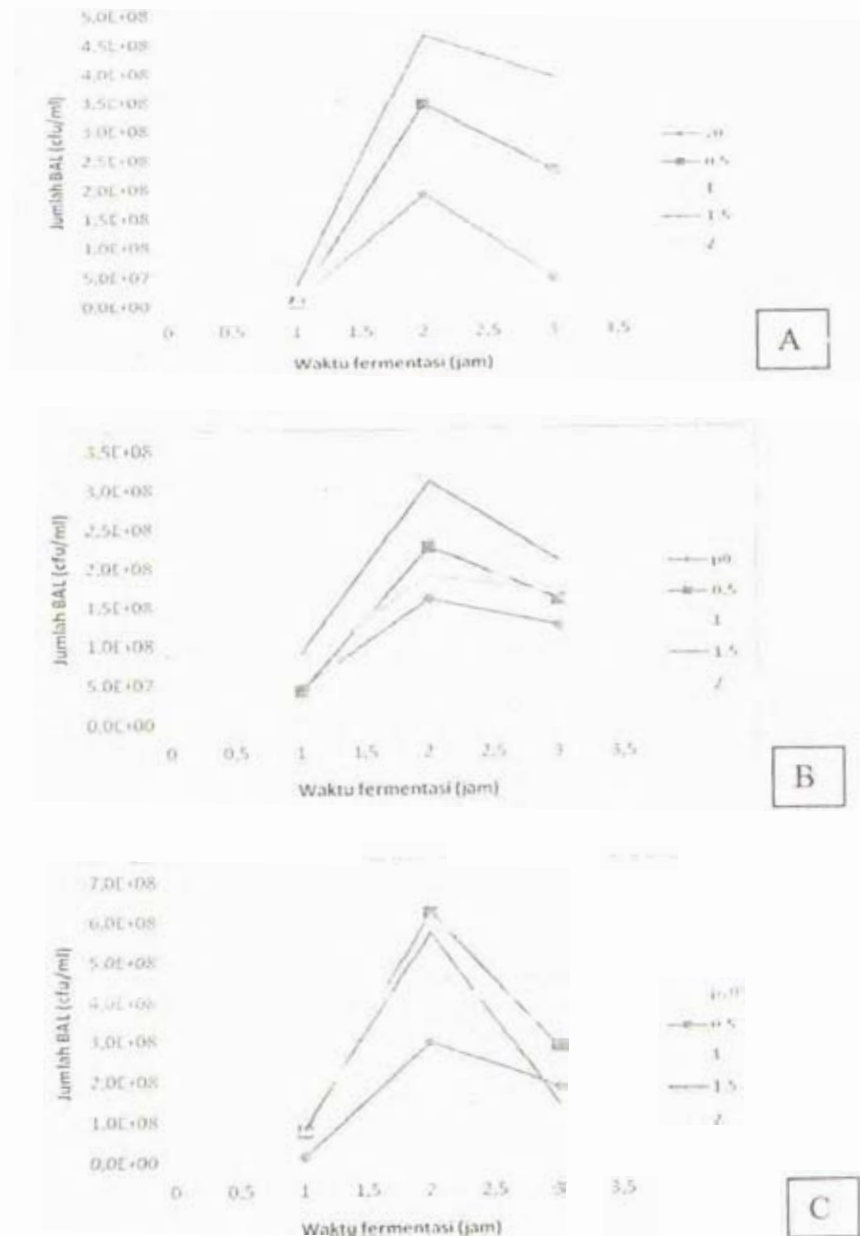
Untuk menghasilkan pati kasava dengan karakteristik mengembang dalam waktu yang lebih singkat, dibutuhkan pengembangan metode fermentasi untuk mempercepat proses yaitu dengan menambahkan sumber nitrogen, nitrogen ini adalah faktor pembatas pertumbuhan BAL untuk tumbuh pada media pati kasava yang oleh sebab itu perlu ditambahkan dari luar. Perubahan keasaman media dan jumlah BAL yang tumbuh merupakan indikator bahwa nutrisi yang diberikan dapat mempengaruhi pertumbuhan BAL tersebut pada media pati kasava mentah (Gambar 11 dan 12).

Penurunan pH selama fermentasi pada berbagai perlakuan penambahan sumber nitrogen menunjukkan kecenderungan yang sama, yaitu semakin besar konsentrasi nutrient diberikan tidak selalu menurunkan pH dengan lebih cepat. Gambar 11 menunjukkan bahwa masing-masing nutrient menghasilkan penurunan pH terendah pada konsentrasi yang berbeda yaitu penambahan yeast ekstrak 1,5 % memberikan nilai pH lebih rendah dibanding konsentrasi lainnya. Penambahan pepton 15 dan 1% memberikan pH terendah dengan penurunan terdrastis dari pH awal adalah pada konsentrasi 1%. Sedangkan penambahan yeast ekstrak : pepton sebesar 1 : 1, menghasilkan penurunan pH terendah pada konsentrasi masing-masing 1%. Diantaranya ketiga perlakuan tersebut, penggunaan nutrient campuran pepton dan yeast ekstrak menghasilkan penurunan pH yang terendah, hal ini berarti bahwa campuran nutrient ini dapat memicu pertumbuhan BAL sehingga dapat menghasilkan asam-asam organik lebih banyak dibanding perlakuan lainnya



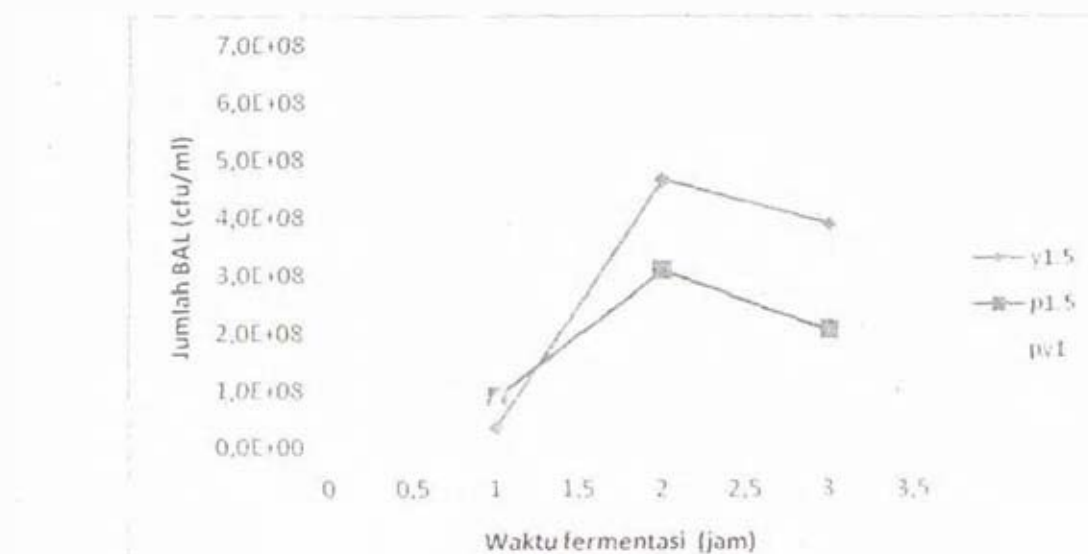
Gambar 11. Perubahan pH selama fermentasi dengan penambahan (A) yeast; (B) pepton dan (C) pepton : yeast = 1 : 1

Penambahan berupa sumber nitrogen pada fermentasi kasava terbukti cukup efektif untuk meningkatkan pertumbuhan BAL, hal ini dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Perubahan jumlah BAL selama fermentasi dengan penambahan (A) yeast; (B) pepton dan (C) pepton : yeast = 1 : 1

Peningkatan jumlah BAL terbesar terdapat pada perlakuan kombinasi pepton dan yeast ekstrak, hal ini dimungkinkan karena yeast ekstrak dan pepton yang digunakan secara bersama-sama dapat memenuhi kebutuhan semua kebutuhan nitrogen dari BAA (Gambar 13). BAL merupakan golongan bakteri yang membutuhkan nutrisi yang kompleks selama pertumbuhannya seperti asam amino, peptida, basa nukleotida, vitamin, mineral, asam lemak dan karbohidrat. Selain itu, BAL memproduksi sejumlah kecil senyawa organik yang memberikan aroma dan flavor pada produk hasil fermentasinya) (Axelsson, 2004; Ercolini *et al.*, 2001; Holzapfel *et al.*, 2001; Jay, 2000; Stiles dan Holzapfel, 1997).



Gambar 13. Perbandingan pertumbuhan BAL dengan penambahan beberapa jenis nutrien

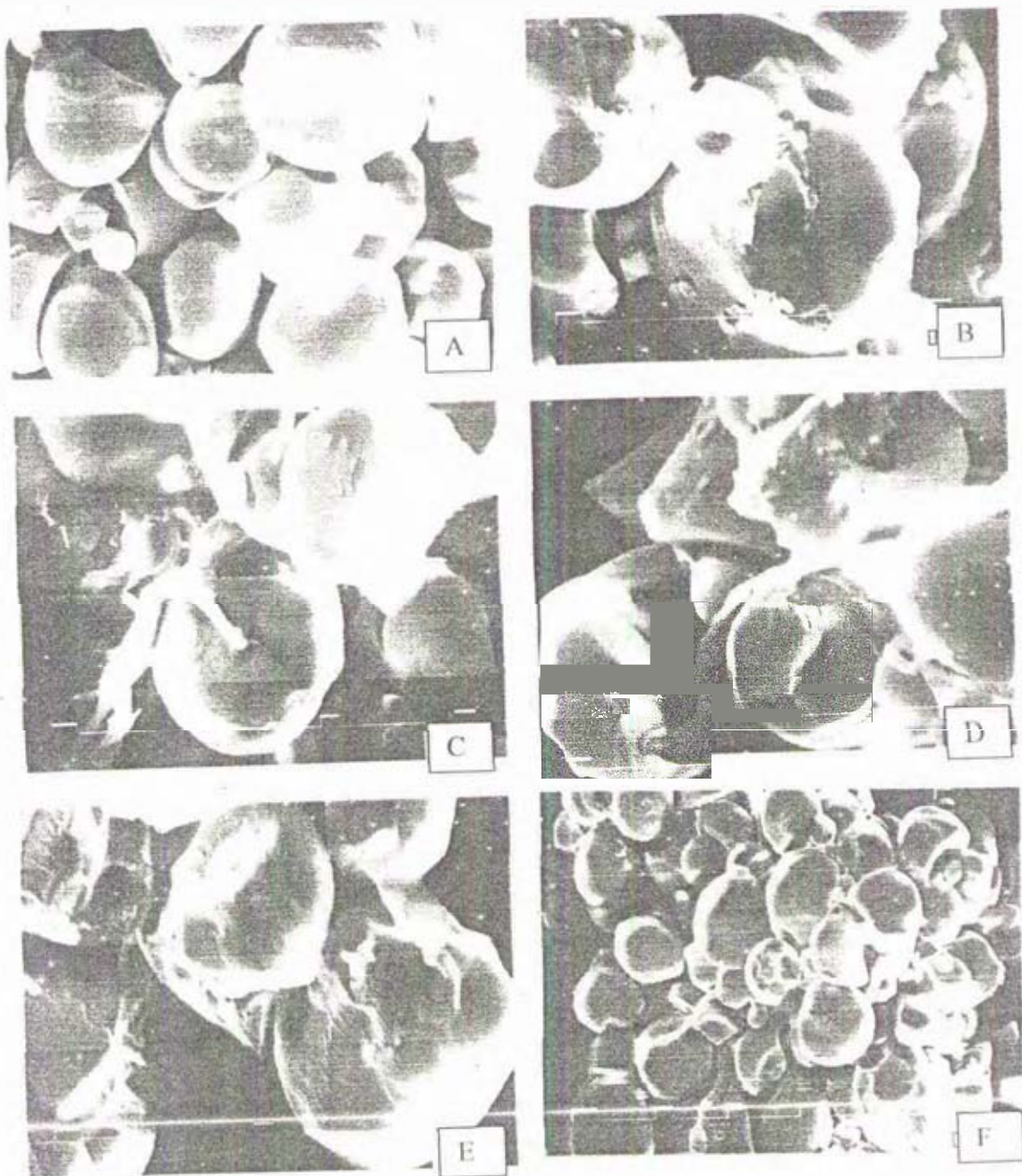
Penambahan yeast ekstrak dan pepton pada media pati kasava mentah, dapat meningkatkan pertumbuhan BAL lebih baik. Oleh sebab itu formulasi ini akan digunakan untuk selama fermentasi untuk menghasilkan pati kasava asam dengan tujuan

untuk memperpendek waktu fermentasi. Penelitian dari Marcon *et al.*(2006) yang menambahkan sirup glukosa untuk memacu produksi asam laktat dapat mengurangi 50% waktu fermentasi menjadi 10 hingga 25 hari. Sedangkan penelitian Anike and Okafor (2008) yang menambahkan glukosa, nitrogen dan fosfat selama fermentasi gari menunjukkan bahwa nutrisi akan dapat meningkatkan pertumbuhan BAL pada batas jumlah tertentu, lebih dari jumlah yang optimal penambahan nutrisi tidak dapat lebih mempercepat pertumbuhan.

4.4. Karakterisasi pati kasava asam

Bakteri asam laktat dengan kemampuan tumbuh dan produksi asam laktat yang terbaik digunakan untuk memfermentasi pati kasava. Pengamatan karakteristik granula pati hasil fermentasi dibandingkan dengan pati kasava tanpa fermentasi. Fermentasi yang dilakukan selama 72 jam ternyata memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kenampakan granula pati dibandingkan dengan pati tanpa fermentasi (Gambar 14).

Granula pati tanpa fermentasi (A) memiliki kenampakan permukaan yang halus, baik pada granula yang pecah maupun yang utuh. Sedangkan granula pati yang difermentasi memiliki kenampakan yang lebih kasar dan terdapat lubang-lubang pada permukaannya. Bagian granula yang rusak besar adalah pada ujung, hal ini menunjukkan bahwa kerusakan berawal dari bagian tersebut. Tipe kerusakan yang ditimbulkan juga berbeda antara dua BAL yang teridentifikasi memiliki jenis yang sama yaitu *Lactobacillus plantarum*.



Gambar 14. Kenampakan granula pati : A. tanpa fermentasi, B. fermentasi dengan *L. fermentum* (type culture 2) dengan kemampuan amilolitik tinggi, C. fermentasi dengan *L. fermentum* A4, D. fermentasi dengan *L. fermentum* B1, E. fermentasi dengan *L. plantarum* B9 dan F. fermentasi dengan *L. plantarum* (type culture 1).

Granula pati pada gambar B adalah *Lactobacillus fermentum* yang memiliki kemampuan tumbuh cepat pada medium pati dengan kemampuan amilolitik yang lebih tinggi. Granula pati tampak diselubungi lapisan yang menyebabkan kerusakan granula tidak hanya terjadi pada bagian ujung tetapi seluruh bagian granula tersebut. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh penelitian Giraud *et al.* (1994) dan Marcon *et al.* (2006), hanya saja kedua penelitian yang telah dilakukan sebelumnya tersebut menggunakan jenis *L. plantarum*. Kerusakan granula pati yang besar dapat mempengaruhi kemampuan granula tersebut dalam menahan gas saat pemanggangan atau penggorengan sehingga pengembangan patinya menjadi lebih rendah.

Kerusakan granula pati pada gambar C dan D lebih kecil dibandingkan pada B, yang kemungkinan disebabkan kemampuan amilolitik yang isolat digunakan lebih rendah. Bagian ujung granula tampak berlubang-lubang karena pada bagian tersebut memang lebih amorf dibandingkan bagian lain dari granula pati ini. Kerusakan pati yang tidak terlalu besar diduga menyebabkan kemampuan pengembangannya lebih baik dibandingkan kontrol maupun pati yang granulanya sudah tidak berbentuk. Sujka and Jamroz (2007) dalam penelitiannya menyatakan bahwa, hidrolisis enzimatis pada pati (amilolisis) dapat mempengaruhi permukaan granula pati dan porositasnya. Porositas dan area permukaan adalah karakteristik yang penting dari material padat, termasuk pati, karena dapat menentukan konduktivitas termal, difusivitas termal, koefisien difusi massa, sifat mekanis dan teksturalnya

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

V.1. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa selama fermentasi pati kasava tumbuh beberapa jenis bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan amilolitik. Isolat BAL yang diperoleh dari fermentasi pati kasava selama 10 hari memiliki kemampuan amilolitik yang lebih besar dibandingkan dengan isolat dari fermentasi 5 hari. Tiga jenis isolat yang memiliki karakteristik amilolitik diidentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* (isolat A4), *Lactobacillus fermentum* 1 (isolat B1) dan *Lactobacillus plantarum* 1 (isolat B9). Perbandingan ketiga isolat dengan isolat type culture yang diperoleh dari Food' and Nutrition Culture Collection PAU UGM, menunjukkan bahwa isolat *Lactobacillus fermentum* A4 mampu tumbuh lebih baik pada pH 3 dan suhu 10°C dibandingkan isolat yang lainnya. Hasil formulasi media kasava yang difermentasi oleh isolat A4 dengan penambahan sumber nitrogen, menunjukkan bahwa kombinasi nutrisi berupa yeast ekstrak : pepton dengan perbandingan 1 : 1 menghasilkan pertumbuhan BAL dan penurunan pH yang lebih cepat dibandingkan dengan penambahan yeast ekstrak saja atau pepton saja. Hasil karakterisasi mikroskopi granula pati kasava yang difermentasi dengan lima isolat berbeda, menunjukkan bahwa pada kondisi dan lama fermentasi yang sama terjadi perubahan struktur granula yang berbeda. Isolat dengan kemampuan amilolitik yang tinggi yaitu *L. fermentum* (type culture) dan *L. fermentum* A4 menghasilkan kerusakan granula yang lebih besar. Akan tetapi kerusakan granula sehingga menyebabkan terbentuknya lubang (cavity) yang besar akan menyebabkan granula pati lebih sulit memuai dan menahan gas saat proses pemanggangan. Kerusakan

granula pati pada fermentasi dengan isolat *L. fermentum* A4 relatif lebih rendah sehingga kemampuan dalam mengembang terjadi lebih baik.

V.2. Saran

Karakteristik isolate *L. fermentum* A4 perlu dieksplorasi lebih lanjut terutama bila akan digunakan sebagai inokulum untuk produksi asam laktat dari pati mentah. Identifikasi isolat berdasarkan struktur DNA 16 S perlu dilakukan untuk mengetahui strainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Agati V.J.P., Guyot J., Morlon-Guyot P., Talamond, Hounhouigan D.J. 1998. "Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin". J Appl Microbiol 85:512-20.
- Anike N. and Okafor, N., 2008. "Secretion of Methionine by Microorganism Associated with Cassava Fermentation", African Journal of Food Agri. Nutr. and Development 8: 77-90.
- Altay, F. and Gunasekaran, S., 2006. "Influence of Drying Temperature, Water Content, and Heating Rate on Gelatinization of Corn Starches", Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 4235-4245.
- Atichokudomchai, W, Varavinit, S., and Chinachoti, P. 2002. "A study of annealing and freeze-thaw stability of acid-modified tapioca starches by differential scanning calorimetry (DSC)". Starch/Starke, 54 : 343-349.
- Axelsson L. 2004. "Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, editors. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects". 3rd rev. and exp.ed. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 1-66.
- Bertolini, A. C., Mestres, C. and Colona, P., 2000, "Rheological Properties of Acidified and UV-irradiated Starches", Starch 52: 340-344.
- Bertolini, A. C., Mestres, C., Colonna, P. and Raffi, J., 2001, "Free Radical Formation in UV- and Gamma-irradiated Cassava Starch", Carbohydrate Polymer 44: 269-271.
- Bertolini, A. C., Mestres, C., Raffi, J., Buleon, A, Lerner, D. and Colona, P., 2001, "Photodegradation of Cassava and Corn Starches," Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 675-682.
- Brabet, C., Chuzel, G., Dufour, D., Rimbault, M. and Giraud, J., 1999. "Improving cassava sour starch quality in Colombia" In: Cassava Flour and Starch, Progress in Research and Development, Ed. D. Dufour, G.M. O'Brien and Rupert Best, p.241 - 246. Centro Internacional de Agricultura Tropical International Center for Tropical Agriculture.
- Bradbury, M.G., Egan, S.V., and Bradbury, J.H. 1999. Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. J. Sci. Food Agric., 79: 593-601.

- Calderon M., Loiseau G., and Guyot J.P. 2001. "Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch". *J Appl Microbiol.* 90:508-16.
- Camargo, C., Colona, P., Buleon, A. and Molard, D, R., 1988, "Functional Properties of Sour Cassava (*Manihot utilissima*) Starch: Polvilho Azedo.", *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 429-435.
- Cappuccino, J.G. and Sherman, N., 1983, " Microbiology : A Laboratory manual". Addison-Wesley Publs. Co. Canada.
- Cardoso, A.H., Mirione, E., Ernesto, M., Massaza, F., Cliff, J., Haque, M.R. and Bradbury, J.H. 2005. "Processing of Cassava Roots to Remove Cyanogens", *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 451-460.
- Chaplin, M. F., 2000. "Carbohydrate Analysis: Introduction". In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R. A. Meyers (Ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 735-741.
- Chatterjee, M., Chakrabarty, S.L., Chattopadhyay, B.D., Mandal, R.K. 1997. "Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*". *Biotechnol Lett* 19:873-4.
- Chukwuemeka, O.C., 2007, "Effect of process modification on the physio-chemical and sensory quality of fufu-flour and dough", *African Journal of Biotechnology* 6 (16) : 1949 – 1953.
- Datta, R and Henry M, 2006. Lactic acid : recent advances in product, processes an technologies- a review. *J. Chem Techno. Biotechnol*, 81 : 1119-29
- Demiate, L. M., Dupuy, N., Huvenne, J. P., Cereda, M. P. and Wosiacki, G., 2000, "Relationship Between Baking Behavior of Modified Cassava Starches and Starch Chemical Structure Determined by FTIR Spectroscopy ", *Carbohydrate Polymer* 42: 149-158.
- Epriliati I., 1994. "Biodegradasi Pati Ubi Kayu (*Manihot utilisima*) selama fermentasi Growol". Skripsi S-1. FTP. UGM. Yogyakarta
- Ercolini D., Moschetti G., Blaiotta G., and Coppola S. 2001. "Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis". *Curr Microbiol* 42:199-202.
- Fannon, J. EL, Hauber, R. J. and BeMiller, J. N. 1992. "Surface Pores of Starch Granules". *Cereal Chem.* 69(3):284-288.

- Fiedorowicz, M., Tomasik, P., Sangguan, Y. and Seung, T. L., 1999, "Molecular Distribution and Pasting Properties of UV-irradiated Corn Starches", *Starch* 51(4): 1459-158.
- Florencio, S. A., Eiras-Stofella, D. R., Soccol, C. R., Raimbault, M., Guyot, J. P and Fontana, J. D. 2000. " *Lactobacillus plantarum* Amylases Acting on Crude Starch Granules". *Appl. Biochem. and Biotech.* 84-86 : 721-730.
- Ghasemi, E., Mosavian, M. T. H. And Khodaparast, M. H. H. 2008. "The Effect of Acetic acid and Lactic acid on the Oil Uptake, Texture and Color of Rice(k g Tarom) During Cooking". *World Appl. Science Journal* 4 (2) : 183-187.
- Giraud, E., Champaviller, A. and Raimbault, M. 1994. "Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*". *Appl Environ Microbiol.* 60:4319-23.
- Gunaratne, A and Corke, H. 2007. "Influence of prior acid treatment on acetylation of wheat, potato and maize starch". *Food Chemistry* 105: 917- 925.
- Guyot, J. P. and Morton-Guyot, J., 2001, "Effect of Different Cultivation Conditions on *Lactobacillus manihotivorans* OND32T, an Amylolytic *Lactobacillus* Isolated from Sour Starch Cassava Fermentation", *International Journal of Food Microbiology* 67: 217-225.
- Guyot, J. P., Brizuela, M. A., Rodriguez-Sanoya, R. and Modon-Guyot, J., 2003, "Characterization and Differentiation of *Lactobacillus manihotivorans* Strains Isolated from Cassava Sour Starch", *International Journal of Food Microbiology* 87: 187-192.
- Guyot, J.P., Calderon, M. and Morlon-Guyot, J. 2000, "Effect of pH control on lactic mid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010", *Journal of Applied Microbiology* 88: 176 – 182.
- Haros, M., Perez, O. E. And Rosell, C. M. 2004. " Effect of Steeping Corn with Lactic Acid on Starch Properties". *Cereal Chem.* 81 (1) : 10 – 14.
- Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., and Schillinger, U. 2001. "Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition". *Am J Clin Nutr* 73 (2): 365S–373S.
- Inyang, C.U., Tsav-Wua, J.A. and Akpapunam, MA, ,2006, "Impact of traditional processing methods on some physico chemical and sensory qualities of fermented cassava flour "Kpor umilin", *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (20) : pp.1985 – 1988.

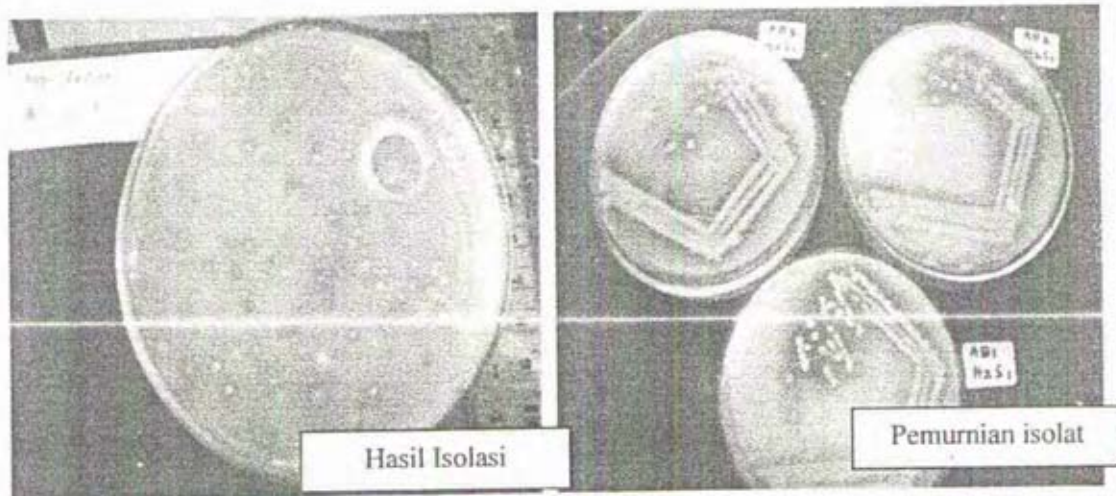
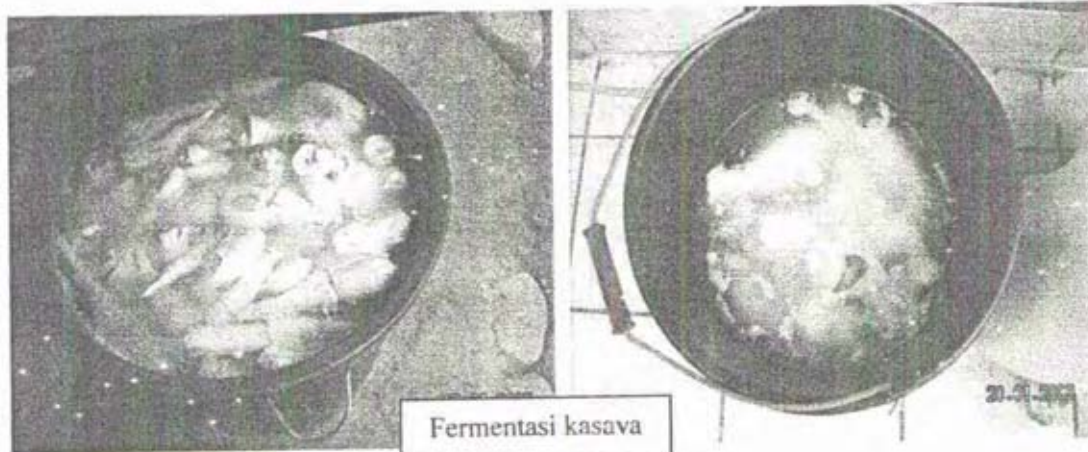
- Jay, J.M. 2000. "Fermentation and fermented dairy products. Modern food microbiology". 6th edition. Gaithersburg, USA: An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. p. 113-30.
- Johansson, M.L., Sanni, A., Lonner, C. and Molin, G. 1995. "Phenotypically-based taxonomy using API 50 CH of lactobacilli from Nigerian Ogi, and the occurrence of starch fermenting strains". *Int J Food Microbiol* 25:159-68.
- Juge, N., Le Gal-Coeffet, M.F., Furniss, M., Guning, A. N., Kramhoft, B., Morris, V.J., Williamson, G, and Svensson, B. 2002. "The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger* : overview of its structure, function, and role in raw-starch hydrolysis". *Biologia, Bratislava*, 57/Suppl. 11: 239-245.
- Lacerda, I. C.A., Miranda, R.L., Borelli, B.M., Nunes, A.C., Nardi, R.M.D., Lachance, M.A. and Rosa, C.A., 2005, "Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil", *International Journal of Food Microbiology* 105: 213-219.
- Lee, J.S., Kumar, R.N., Rozman, H.D. and Azemi, B.M.N., 2005, "Pasting, swelling and solubility properties of UV initiated starch-graft-poly (AA)", *Food Chemistry* 91: 203 - 211.
- Lei, V., Amoa-Awua, W. K. A. And Brimer, L. 1999. " Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganism". *International Journal of Food Microbiology* 53 (2-3) : 169-184.
- Marcon, M.J.A., Vieira, MA. Santos, K. De Simas, K.N., Amboni, R.D.M.C. and Amante, E.R. 2006. " The effect of fermentation on cassava starch microstructure". *Journal of Food Process Engineering* 29: 362-372.
- Mestres, C. and Rouau X, Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. *J Sci Food Agric* 74:147±155 (1997).
- Metres, C., Zakhia, N. and Dufour, D., 1997, "Functional and Physico-chemical Properties of Sour Cassava Starch", In: *Starch Structure and Functionality* (R. J. Fraziers, R. Richmon, and A. M. Donald, eds.) The Dough Society of Chest. Information Service.
- Morlon-Guyot J., Guyot J.P, Pot, B, Jacobe de Haut, I., Raimbault, M. 1998. "*Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation". *Int J Syst Bacteriol* 48:1101-9.

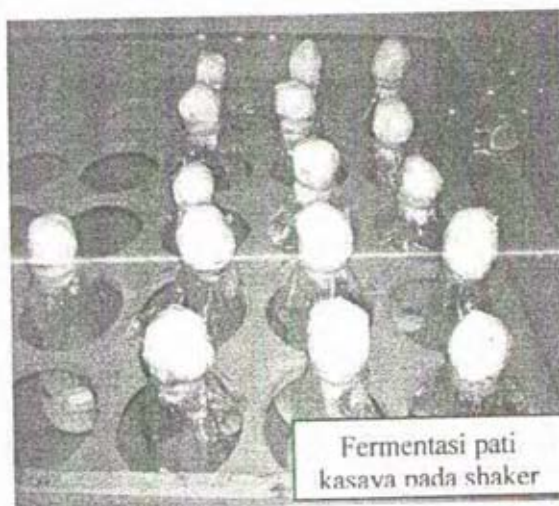
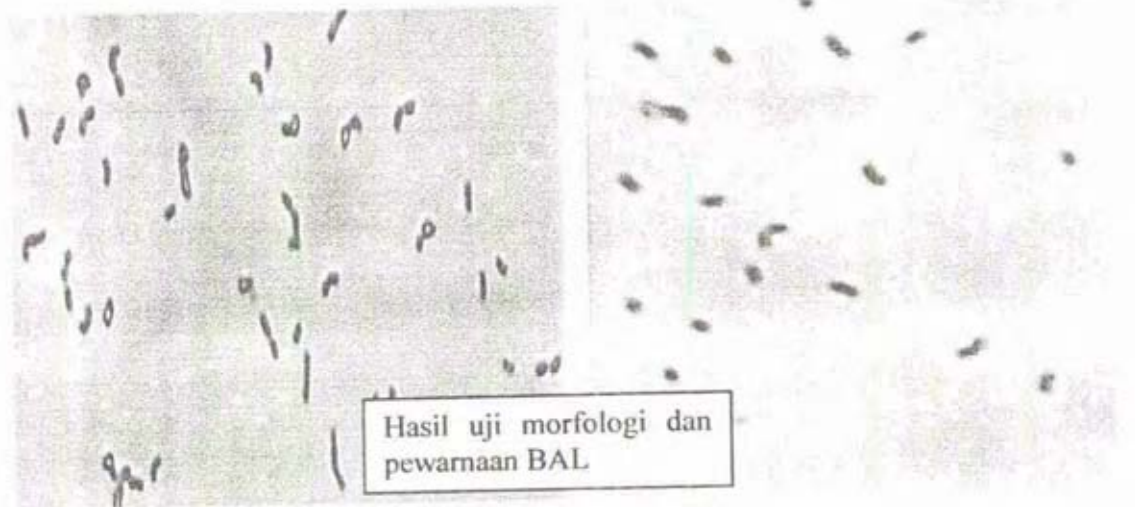
- Murphy P., 2000. "Handbook of Hydrocolloids". Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Muttarokah., 1998. "Bakteri asam Laktat pada Makanan Hasil Fermentasi di daerah istimewa Yogyakarta". Skripsi. FTP, UGM. Yogyakarta.
- Ngatirah., 2000. "Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol". Tesis S-2. Pasca Sarjana. UGM. Yogyakarta
- Nakamura, L.K. 1981. "*Lactobacillus amylolyticus*. A new starch hydrolyzing species from swine waste corn fermentation". *Dev Ind Microbiol* 20:531-40
- Naveena BJ, Vishnu C, Altaf Md, Reddy G. 2003, "Wheat bran an inexpensive substrate for production of lactic acid in solid state fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6-optimization of fermentation conditions". *J Sci Ind Res* 62:453-6.
- Nwabueze, T.U. and Odunsi, F.O., 2007, "Optimization of process conditions for cassava (*Manihot esculenta*) lafun production", *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (5) : pp.603-611.
- Nwankwo D, Anadu E and Usoro R. 1989. "Cassava fermenting organisms". *MIRCEN J* 5:169-79.
- Olympia M., Fukuda H., Ono H, Kaneko Y. and Takano, M. 1995. "Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, "Burong Isda," and its amylolytic enzyme". *J Ferment Bioeng* 80:124-30.
- Phambu, N., Meya, A. S. and Anovitz, L., 2007, "Direct Detection of Residual Cyanide in Cassava Using Spectroscopic Techniques", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10135-10140.
- Plata-Oviedo, M. and Camargo, C., 1998, "Effect of Acid Treatments and Drying Processes on Physico-chemical Functional Properties of Cassava Starch". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 103-108.
- Pudyastuti, Rini., 2000. "Kajian Bakteri Proteolitik Asam pada Makanan Fermentasi". Skripsi S-1. FTP, UGM. Yogyakarta.
- Rascana, A.P., 1986. "Mikroflora Fermentasi Growol Tradisional". Skripsi S-I. FTP, UGM. Yogyakarta.
- Rahayu, E.S., Djaffar, T.F., Wibowo, D and Sudarmadji S., 1996. "Lactic Acid Bacteria from Indigenous Fermented Food and Their Antimicrobial Activity". *Journal Indonesian Food and Nutrition Progress*. Vol. 3, no. 2: 21 - 27.

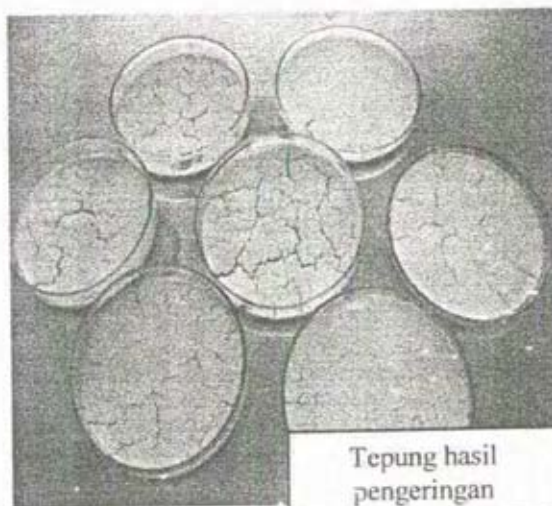
- Rutenberg, M. W. and Solarek, D., 1984. "Starch Derivatives: Production and Uses". In: Starch Chemistry and Technology (Whistler, R. L., BeMiller, J. N. and Pashall, E. F., eds). Academic Press, London.
- Sanni A., Morlon-Guyot, J. and Guyot J.P. 2002. "New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods". *Int J Food Microbiol* 72:53–62.
- Sobowale, A.O., Olurin, T.O. and Oyewole, O.B. 2015. "Effect of lactic acid bacteria starter culture fermentation of cassava on chemical and sensory characteristics of fufu flour". *African Journal of Biotechnology* 6(16): 1954 – 1958
- Sriroth, K., Wanlapatit, S., Kijkhunasatian, C., Sangseethong, K., and Piyachomkwan, K. 2002. "Application of Ozone in the Sago Starch Industry". In: *New Frontiers of Sago Palm Studies* (Kainuma, K., Okazaki, M., Toyoda, Y. and Cecil, J. E, eds). Universal Academic Press, Tokyo.
- Stiles ME and Holzapel ,WH. 1997- "Review article: lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy". *Int J Food Microbial* 36:1-29
- Sujka, M. and Jamroz, J. 2007. "Starch granule porosity and its changes by means of amyolysis". *Int. Agrophysics* 21: 107-113
- Svensson, B., Jensen, M. T., Mori, H., Bak-Jensen, K. S., Bonsager, B., Nielsen, P. K., Kramhoft, B., Praetorius-Ibba, M., Noh, J., Juge, N., Greffe, L., Williamson, G. and Driguez, H., 2002. "Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13". *Biologia, Bratislava*, 57/Suppl. 11: 5 – 19.
- Takizawa, F. F., da Silva, G. O., Konkel, F. E. and Demiate, I. M., 2004, "Characterization of Tropical Starches Modified with Potassium Permanganate and Lactic Acid", *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47: 921-931.
- Vatanasuchart, N., Naivikul, O., Charoenrein, S., and Sriroth, K., 2003. Influence of Different W irradiation on Properties of Cassava Starch and Biscuit Expansion. *Proceedings of the Starch Update 2003*, 19-20 July 2003, Pattaya.
- Vatanasuchart, N., Naivikul, O., Charoenrein, S. and Sriroth, K., 2005, "Molecular Properties of Cassava starch Modified by Different W Irradiations to Enhance Baking Expansion", *Carbohydrate Polymer* 61: 80-87.
- Vishnu C., Seenayya G., and Reddy, G. 2000. "Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid by amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6". *Bioprocess Eng* 23:155–8.

- Vishnu C., Seenayya G., and Reddy G. 2002. "Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6". *World J Microbiol Biotechnol* 18:429-33.
- Wang, Y. J., Truong, V. D. and Wang, L. 2003. "Structure and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis". *Carbohydrate Polymer*, 52,327-333.
- Wee, Y.J., Kim, J.N. and Ryu, H.W. 2006. "Biotechnological production of lactic acid and its recent applications". *Food Technol Biotechnol* 44: 163-72.
- WHO, 1994. "Ultraviolet Radiation". *Environmental Health Criteria* 160, Geneva, Switzerland.
- Witono, Y., 2008, "Peran Bioteknologi pada produk pangan yang thoyyib dari bahan local untuk ketahanan pangan nasional" dalam: *Prosiding Seminar Nasional, Peran Bioteknologi bagi Kesejahteraan Umat*", Yayasan Memajukan Bioteknologi Indonesia (YMBI) dengan Lembaga Pengkajian Pangan, Obat dan Kosmetika, Yogyakarta.
- Xu, A.S. and Seib, P., 1993, "Structure of Tapioca Pearls Compared to Starch Noodles from mung Beans", *Cereal Chemistry* 70(4): 463-470.
- Zweifel, C., Conde-Petit, B. and Escher, F., 2000, "Thermal Modification of Starch During High-Temperature Drying of Pasta", *Cereal Chemistry* 77(5): 645-651.

LAMPIRAN 1. Dokumentasi penelitian



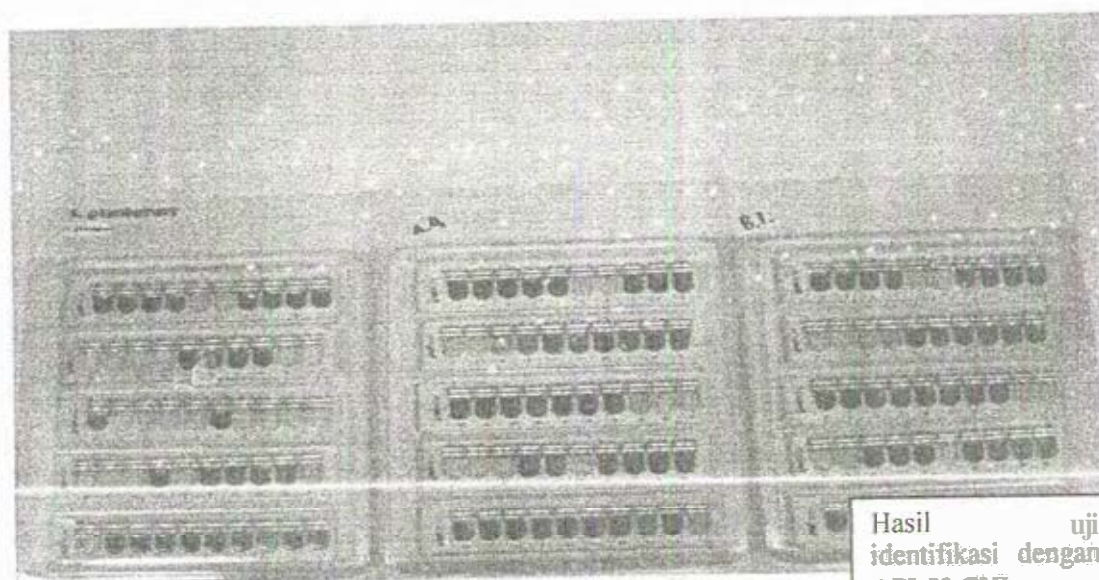




Tepung hasil pengeringan



Analisis pengembangan pati



Hasil uji identifikasi dengan API 50 CHL

Lampiran 2. Artikel Ilmiah

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT AMILOLITIK DARI FERMENTASI PATI KASAVA

Widya Dwi Rukmi Putri¹, Elok Zubaidah, Dian Widya Ningtyas, Nur Hidayat

Abstrak

Bakteri asam laktat (BAL) amilolitik berperan penting pada pembuatan pati kasava asam. Fermentasi asam laktat dan sinar matahari mempengaruhi karakteristik pengembangan pati tersebut. Isolasi untuk mendapatkan BAL yang indigeneous dan potensial dari fermentasi pati kasava akan bermanfaat untuk diaplikasikan sebagai inokulum murni pada proses tersebut. Isolat BAL dari fermentasi pati kasava selama 10 hari memiliki karakteristik amilolitik yang lebih besar. Tiga jenis isolat yang memiliki karakteristik amilolitik diidentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* (isolat A4), *Lactobacillus fermentum* I (isolat B1) dan *Lactobacillus plantarum* I (isolat B9). Perbandingan ketiga isolat dengan isolat type culture yang diperoleh dari Food and Nutrition Culture Collection PAU UGM, menunjukkan bahwa isolat *Lactobacillus fermentum* A4 mampu tumbuh lebih baik pada pH 3 dan suhu 10°C dibandingkan isolat yang lainnya.

Kata kunci: Pati kasava asam, Bakteri Asam Laktat, Amilolitik

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AMYLOLYTIC LACTIC ACID BACTERIA FROM CASSAVA STARCH FERMENTATION

Abstract

Amylolytic lactic acid bacteria (LAB) play an important role in the preparation of sour cassava starch. In the production of sour cassava starch, lactic acid fermentation and sun drying are related to the baking ability. Isolates of LAB from cassava starch fermentation for ten days, have a higher amylolytic characteristics. Three isolates were identified as *Lactobacillus fermentum* (isolate A4), *Lactobacillus fermentum* I (isolate B1) dan *Lactobacillus plantarum* I (isolate B9). The differences of these isolates with isolates from Food and Nutrition Culture Collection PAU UGM showed that *Lactobacillus fermentum* A4 has a better ability to grow in low pH medium (pH 3) and low temperature (10°C) than another isolates.

Keyword : pufikasava asam, lactic acid bacteria, starch granule

Pendahuluan

Bakteri asam laktat (BAL) terutama *Lactobacillus*, telah di i u i memiliki peran penting pada fermentasi pati kasava asam. Aktivitas BAL pada fermentasi bahan berpati tersebut berperan terhadap perubahan karakteristik produk untuk produksi asam laktat, enzim spesifik, dan senyawa aromatik (Camargo *et al.*, 1988; Cereda *et al.*, 1995; Demiate *et al.*, 1999; Marcon *et al.*, 2006). Asam laktat yang dihasilkan menyebabkan pula perubahan mikrostruktur patinya sehingga mempengaruhi sifat amilografi dan viskositasnya (Bertolini *et al.*, 2000; Plata-Oviedo and Camargo, 1998).

Kajian mikrobiologis pada fermentasi alami pati kasava asam produksi industri di Columbia mengarah kepada isolasi bakteri asam laktat amilolitik, *L. manihotivorans* yang bersifat homolaktik menghasilkan lebih dari 98% L(+)-asam laktat (Marlon-Guyot *et al.*, 1998), sedangkan Lacerda *et al.* (2005) menemukan *L. plantarum* dan *L. fermentum* yang dominan pada fermentasi alami di 2 pabrik di Brazil, selain itu juga menemukan *L. perolans* dan *L. brevis*. Selanjutnya, hasil isolasi Anike and Okafor (2008) menunjukkan bahwa *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus sp.* menghasilkan kadar metionin yang tertinggi pada kasava terfermentasi, yang menunjukkan kemampuan bakteri tersebut pada media berbasis kasava.

Bakteri asam laktat amilolitik telah didapatkan dari berbagai makanan terfermentasi dari bahan berpati, terutama dari kasava dan sereal (jagung dan sorgum). strain dari *Lactobacillus plantarum* telah diisolasi dari produk kasava terfermentasi yang berasal dari Afrika (Nwankwo *et al.*, 1989), dan spesies baru *Lactobacillus manihotivorans* (Morlon-Guyot *et al.*, 1998) yang diisolasi dari fermentasi pati kasava asam di Colombia. Olympia *et al.* (1995) melakukan karakterisasi strain amilolitik *L. plantarum* dari burung isda, makanan terfermentasi terbuat dari ikan dan beras di Filipina. Strain amilolitik *L. fermentum* juga telah diisolasi pertama kalinya dari adonan asam jagung Benin (ogi dan mawe) oleh Agati *et al.* (1998). Selanjutnya, Sanni *et al.* (2002) menjelaskan strain amilolitik *L. plantarum* dan *L. fermentum* pada berbagai makanan tradisional berbasis pati terfermentasi dari Nigeria. Pencarian BAL amilolitik dari makanan berpati yang terfermentasi didasarkan pada tingginya kandungan pati dari bahan bakunya. Berdasarkan kemampuan α -amilase yang dimiliki untuk menghidrolisa pati secara parsial, BAL amilolitik dapat memfermentasi berbagai macam bahan baku berpati, seperti jagung, (Nakamura, 1981), kentang atau kasava (Giraud *et al.*, 1994) dan substrat yang diperoleh dari bahan berpati lainnya (Naveena *et al.*, 2003; Vishnu *et al.*, 2002). BAL amilolitik dapat mengubah pati secara langsung menjadi asam laktat (Gambar 2). BAL amilolitik menggunakan biomassa berpati dan mengubahnya menjadi asam laktat dalam fermentasi langsung.

Beberapa strain *Lactobacillus spp.* menghasilkan amilase ekstraseluler dan memfermentasi pati secara langsung menjadi asam laktat. Hal ini disebabkan karena fermentasi dengan BAL amilolitik akan menggabungkan dua proses yaitu hidrolisis enzimatis substrat karbohidrat (pati) sekaligus fermentasi yang memanfaatkan gula yang dihasilkan menjadi asam laktat (Reddy *et al.*, 2008). Asam laktat juga dapat dihasilkan langsung dari pati dengan fermentasi menggunakan BAL yang memiliki kemampuan produksi amilase ekstraseluler (Petrov, *et al.*, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan BAL yang amilolitik yang dapat dimanfaatkan untuk memfermentasi pati kasava dalam waktu cepat, juga dapat

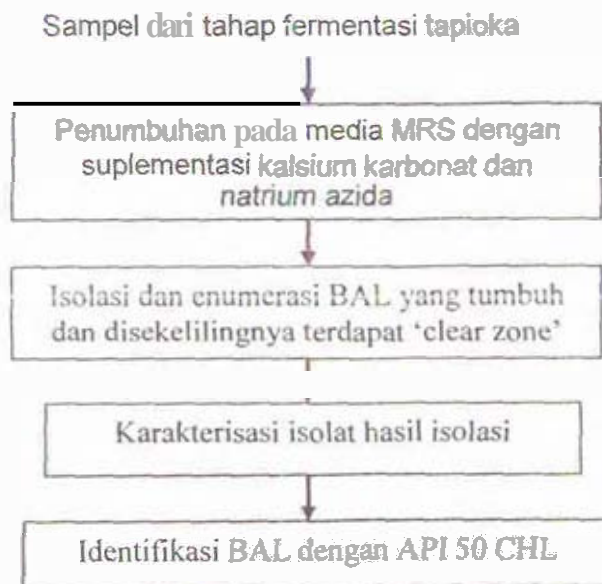
digunakan sebagai inokulum untuk produksi asam laktat dari pati mentah.

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah pati kasava mentah dari industri tapioca di Pati. Bahan lainnya adalah pati larut (*soluble starch*), media MRS broth (OXOID), yeast ekstrak, pepton bacteriological, agar, aquades, alcohol, spiritus, kapas dan kertas. Alat-alat yang digunakan adalah peralatan gelas (*glass ware*), perangkat alat penyinaran UV, shaker, incubator, laminar air flow, mikropipet set, stirrer, vortex, autoklaf, spektrofotometer, buret dan scanning electron microscopy (SEM).

Rancangan Penelitian

Sampel untuk isolasi diambil dari tahap fermentasi kasava pada industri tapioka. Kemudian dari masing-masing hatch diambil sampel secara acak, untuk isolasi dan enumerasi BAL. Isolasi dan enumerasi dilakukan dengan metode *dilution plating* dalam medium MRS agar yang ditambahkan kalsium karbonat. Setelah dilakukan pemurnian, isolat akan disimpan pada suhu -40°C . Isolat bakteri asam laktat yang diperoleh selanjutnya akan diidentifikasi dengan melihat sifat-sifat morfologi dan fisiologisnya seperti bentuk dan ukuran sel, reaksi Gram, uji katalase dan uji sifat amilolitiknya. Uji biokimiawi akan menggunakan API50. Berdasar pada karakter isolat akan diidentifikasi spesiesnya.



Gambar 1. Diagram alir penelitian isolasi bakteri asam laktat

b. pH (Cappuccino and Sherman., 2005 dengan modifikasi)

1. Isolat terpilih diinokulasikan pada media MRSB kemudian ditumbuhkan pada pH yang berbeda yaitu pH 4, pH 6, dan pH 8 lalu diinkubasikan selama 48 jam.
2. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan *Spektrofotometer* dengan panjang gelombang 600nm pada waktu tumbuh 0 jam, 24 jam dan 48 jam.

Hidrolisis Pati

1. Isolat terpilih yang berumur 24 jam diinokulasikan pada media *Starch Broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada inkubator pada suhu 37°C.
2. Diambil 1 ml suspensi media menggunakan blue tip dan mikropipet 1 ml dan dimasukkan kedalam mikrotube.
3. Disentrifuse dingin dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 3°C selama 10 menit.
4. Supernatan yang ada pada mikrotube kemudian diambil dan diencerkan dengan aquades sampai 100 ml.
5. Diambil larutan hasil pengenceran tadi sebanyak 10 ml kemudian ditetaskan iodine 1 ml kemudian ditera pada *Spektrofotometer* pada panjang gelombang 590nm.

Hasil dan Pembahasan.

Isolasi bakteri asam laktat amilolitik dari fermentasi kasava

Mikroorganisme yang tumbuh selama fermentasi kasava bersukses sesuai dengan kondisi lingkungan tempat hidupnya, termasuk pula bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat yang bersifat amilolitik akan tumbuh pada substrat yang tinggi kandungan patinya atau sumber karbon utamanya adalah pati. Isolasi BAL pada fermentasi kasava diharapkan akan memperoleh BAL *indigeneous* yang memiliki kemampuan tumbuh cepat pada media yang sama dm bersifat amilolitik. Hasil isolasi BAL amilolitik pada fermentasi kasava pada pembuatan growol tidak memperoleh isolat yang potensial dalam degradasi pati karena uji kualitatif menggunakan media *starch-agar* tidak menghasilkan zona jernih yang jelas. Sedangkan beberapa isolat yang diperoleh dari fermentasi pati dari industri pati rakyat memiliki karakter amilolitik yang lebih jelas. Oleh sebab itu isolat hasil isolasi dari pati kasava terfermentasi yang dilaporkan pada penelitian ini.

Selama fermentasi pati kasava sumber karbon yang dapat dimanfaatkan oleh mikrobia terutama adalah dari pati, itulah sebabnya terdapat beberapa isolat dengan karakter amilolitik. Isolat non amilolitik akan sulit tumbuh atau hanya tumbuh bila sebagian pati telah didegradasi menjadi gula, sedangkan isolat dengan karakter amilolitik yang lemah akan tumbuh lebih lambat. Tabel 1 menunjukkan bahwa pada fermentasi pati selama 5 hari masih terdapat bakteri yang bukan BAL dm BAL yang mampu tumbuh dan memiliki karakter amilolitik walaupun lemah. Tabel 1 dan 2 menunjukkan bahwa BAL hasil isolasi didominasi isolat dengan bentuk batang (*Lactobacillus*). Karakteristik BAL adalah gram positif, tidak membentuk spora, katalase negative, anaerob tetapi aerotoleran (untuk bentuk bulat dan batang) yang toleran terhadap asam dan memproduksi asam laktat sebagai produk akhir terbesar selama fermentasi gula (Axelsson, 2004).

Tabel 1. Karakteristik isolat hasil isolasi dari fermentasi pati kasava selama 5 hari

Isolat Fermentasi 5 Hari	Gram (+/-)	Katalase (+/-)	Amilolitik (+/-)	Morfologi
A1	+	-	-	Batang pendek
A2	+	-	-	Batang sgt pendek
B1	+	-	-	Batang pendek
B2	+	-	-	Batang pendek
B3	+	-	-	Batang pendek
B4	+	-	-	Batang sgt pendek
B5	+	-	-	Batang pendek
B6	-	-	+	Batang panjang
B7	+	-	-	Batang sgt pendek
B8	+	-	+	Batang sgt pendek
B9	+	-	-	Batang pendek
B10	+	-	+	Batang pendek
B11	-	-	+	Batang sgt pendek
B12	+	-	-	Batang pendek
B13	+	-	-	Batang pendek
B14	+	-	+	Batang pendek
B15	-	-	+	Batang sgt pendek
B16	+	-	-	Batang pendek
B17	+	-	-	Batang pendek
B18	+	-	-	Batang pendek

Tabel 2. Karakteristik isolat hasil isolasi dari fermentasi pati kasava selama 10 hari

Isolat Fermentasi 10 Hari	Gram (+/-)	Katalase (+/-)	Amilolitik (+/-)	Morfologi
A1	+	-	-	Batang sedang
A2	+	-	-	Batang pendek
A3	+	-	-	Batang pendek
A4	+	-	++	Batang pendek
A5	+	-	-	Batang pendek
A6	+	-	-	Batang pendek
A7	+	-	-	Batang panjang
A8	+	-	-	Batang pendek
B1	+	-	++	Batang pendek
B2	+	-	-	Batang pendek
B3	+	-	-	Batang pendek
B4	+	-	-	Batang sgt pendek
B5	+	-	-	Batang pendek
B6	+	-	-	Batang pendek
B7	+	-	-	Batang pendek
B8	+	-	-	Batang pendek
B9	+	-	++	Batang sgt pendek

Keterangan : + menunjukkan karakter positif, ++ menunjukkan karakter positif yang lebih jelas

Penelitian yang dilakukan oleh Guyot and Morlon-Guyot (2001), Morlon-Guyot *et al.* (1998), Lacerda *et al.* (2005) dan Sami *et al.* (2002) dengan sampel makanan

tradisional berbasis pati terfermentasi, juga menghasilkan hal yang sama. Guyot dan Morlon-Guyot (2001) menyatakan bahwa selama ekstraksi pati secara basah pada prosesing kasava terjadi pembuangan gula-gula. Pada kondisi ini bersama dengan produksi CO_2 merupakan kondisi yang cocok untuk sintesis amilase oleh BAL meskipun demikian agaknya sangat terbatas karena kandungan sumber nitrogen dalam kasava.

Isolat BAL yang diperoleh dari fermentasi pati yang lebih lama semakin besar karakter amilolitiknya (Tabel 4), hal ini dimungkinkan karena lebih besarnya sintesis amilase yang terjadi. Seperti pernyataan Axelsson *et al.* (2004), semakin lama pertumbuhan BAL semakin banyak glukosa yang dibutuhkan untuk proses: glikolisis sehingga bakteri tersebut berusaha memproduksi amilase yang lebih banyak untuk mendegradasi pati menjadi glukosa yang dimanfaatkan lebih lanjut untuk proses metabolismenya dalam menghasilkan energi. Reddy *et al.* (2008) juga menyatakan, bahwa beberapa spesies BAL menghasilkan amilase ekstraseluler dan memfermentasi pati secara langsung menjadi asam laktat. Hal ini disebabkan karena fermentasi dengan BAL amilolitik akan menggabungkan dua proses yaitu hidrolisis enzimatis substrat karbohidrat (pati) sekaligus fermentasi yang memanfaatkan gula yang dihasilkan menjadi asam laktat.

Identifikasi isolat

Ketiga isolat yang diperoleh dari fermentasi pati kasava selama 10 hari diidentifikasi lebih lanjut untuk mengetahui apakah semuanya berasal dari spesies yang sama atau tidak, identitas isolat tersebut juga dibandingkan dengan isolat koleksi yang sudah diketahui spesiesnya yaitu *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum*, yang diperoleh dari Food and Nutrition Culture Collection, PAU Pangan dan Gizi, UGM. Hasil identifikasi dengan kit API 50 CHL strip yang terdiri dari 49 jenis karbohidrat adalah pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Isolat Amilolitik dengan kit API 50 CHL

Kode Isolat	Hasil identifikasi	Keterangan
A4	<i>Lactobacillus fermentum</i> 2	99,6 % good identification
B1	<i>Lactobacillus fermentum</i> 1	99,9 % excellent identification
B9	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99,8 % excellent identification
Type culture 1	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99,8 % excellent identification
Type culture 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> 2	99,8 % excellent identification

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ketiga isolat yang diperoleh merupakan dua spesies yang berbeda. Akan tetapi terdapat kemungkinan *Lactobacillus fermentum* 1 dan *Lactobacillus fermentum* 2 adalah spesies yang sama dengan strain yang berbeda, oleh sebab itu ketiga isolat ini akan diuji lebih lanjut untuk mengetahui apakah isolat tersebut berbeda satu dengan yang lain dan dengan isolat type culture yang telah ditemukan sebelumnya.

Karakterisasi isolat BAL amilolitik dalam degradasi medium berbasis pati

Kemampuan isolat dalam degradasi pati sangat menentukan kemampuan tumbuhnya pada medium berbasis pati dan produksi asam laktat. Oleh sebab itu kelima isolat yang teridentifikasi diseleksi lebih lanjut untuk mengetahui isolat yang paling potensial, yang nantinya akan digunakan sebagai inokulum dalam fermentasi pati untuk menghasilkan pati yang mengembang saat pemanggangan. Hasil seleksi ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik pertumbuhan isolat pada pH rendah

Sampel	pH 3 (OD absorbansi pada 600 nm)		
	0 jam	24 jam	48 jam
A4	0,011	0,538	0,603
B1	0,034	0,366	0,524
B9	0,026	0,068	0,152
L. plantarum	0,03	0,345	1,004
L. fermentum	0,016	0,469	1,337

Sampel	pH 4 (OD absorbansi pada 600 nm)		
	0 jam	24 jam	48 jam
A4	0,007	1,838	3,605
B1	0,01	1,897	3,305
B9	0,009	1,854	3,74
L. plantarum	0,001	4,72	5,124
L. fermentum	0,006	5,02	5,012

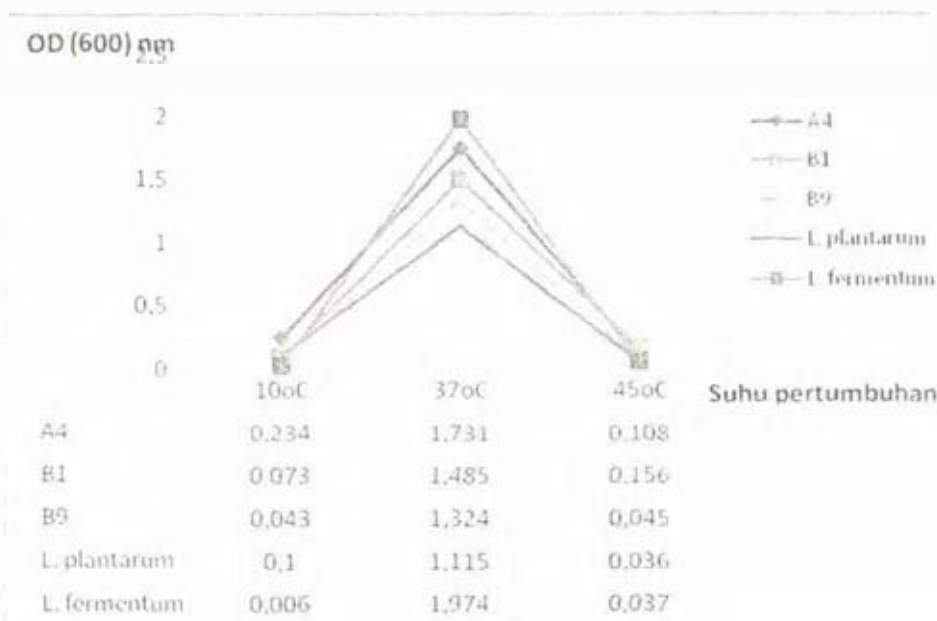
Sampel	pH 5 (OD absorbansi pada 600 nm)		
	0 jam	24 jam	48 jam
A4	0,015	1,983	4,995
B1	0,012	1,961	4,737
B9	0,016	6,035	6,364
L. plantarum	0,005	6,798	8,583
L. fermentum	0,008	7,003	8,318

Seleksi kemampuan tumbuh isolat pada kondisi media yang asam diperlukan untuk mengetahui isolat yang tahan pada kondisi pH rendah, karakteristik ini akan sangat bermanfaat untuk aplikasi isolat tersebut sebagai inokulum pada pembuatan berbagai produk terfermentasi terutama yang berujuan untuk menghasilkan asam laktat. Pada pembuatan pati kasava asam, asam laktat merupakan komponen penting yang dapat menyebabkan degradasi pati, mengubah struktur pati dan mengakibatkan perubahan karakteristik granula pati. Perlakuan asam dapat memodifikasi granula tanpa

menyebabkan perubahan yang substansial pada bentuk granula patinya (Gunaratne dan Corke, 2007).

Isolat yang tahan pH rendah akan tetap dapat tumbuh dengan baik dan menghasilkan produk metabolit asam organik walaupun isolat tersebut tidak dipisahkan dari mediumnya. Isolat A4 merupakan isolat yang lebih tahan pH rendah (pada pengamatan jam ke-24) daripada isolat yang lainnya, sedangkan isolat type culture *L. plantarum* dan *L. fermentum* tetap mampu tumbuh pada inkubasi jam ke-48 pada suhu rendah. Perbedaan kemampuan ini kemungkinan disebabkan karena isolat type culture diisolasi dari medium yang asam sehingga ketahanan pada pH asam lebih baik. Kelima isolat rata-rata mampu tumbuh pada pH 4 dan 5.

Isolat yang akan digunakan sebagai inokulum pada suatu proses fermentasi juga diinginkan memiliki kemampuan tumbuh pada range suhu yang berbeda, hal ini dapat bermanfaat untuk mengantisipasi perubahan suhu selama proses fermentasi berlangsung atau dalam usaha untuk mempercepat atau memperlambat proses. Kelima isolat memiliki kemampuan yang berbeda selama ditumbuhkan pada suhu 10, 37 dan 45°C. Semua isolat mampu tumbuh baik pada suhu 37°C yang adalah memang suhu optimal bagi pertumbuhan berbagai jenis BAL. Axelsson (2004) menyatakan bahwa BAL dapat tumbuh pada suhu 5 – 45°C dan toleran terhadap kondisi asam, dengan sebagian besar strain mampu tumbuh pada pH 4,4. Pertumbuhannya optimum pada pH 5,5 – 6,5 dan membutuhkan nutrisi kompleks seperti asam amino, peptida, basa nukleotida, vitamin, mineral, asam lemak dan karbohidrat.



Gambar 2 Kemampuan tumbuh lima isolat BAL pada berbagai suhu.

Isolat A4 tumbuh lebih baik pada suhu 10°C dibandingkan dengan isolat lainnya, sedangkan pada suhu 45°C isolat B1 tumbuh lebih baik walaupun tidak berbeda nyata dengan isolat A4 (Gambar 10). Isolat A4 merupakan isolat hasil isolasi dari pati kasava dengan kemampuan tumbuh yang terbaik pada pH rendah dan suhu rendah, kemampuannya ini menyebabkan isolat A4 paling potensial digunakan untuk memfermentasi pati kasava.

Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa selama fermentasi pati kasava, tumbuh beberapa jenis bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan amilolitik. Isolat BAL yang diperoleh dari fermentasi pati kasava selama 10 hari memiliki kemampuan amilolitik yang lebih besar dibandingkan dengan isolat dari fermentasi 5 hari. Tiga jenis isolate yang memiliki karakteristik amilolitik diidentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* (isolate A4), *Lactobacillus fermentum* I (isolate B1) dan *Lactobacillus plantarum* I (isolate B9). Perbandingan ketiga isolate dengan isolate type culture yang diperoleh dari Food and Nutrition Culture Collection PAU UGM, menunjukkan bahwa isolat *Lactobacillus fermentum* A4 mampu tumbuh baik pada pH 3 dan suhu 10°C dibandingkan isolat lainnya.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Dana DIPA Universitas Brawijaya, Lembaga Penelitian Universitas Brawijaya yang telah membantu pengurusan administrasi pada penelitian ini dan pembimbing dan pimpinan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya.

Daftar Pustaka

- Agati VJR., Guyot J., Morlon-Guyot P, Talamond, Hounhouigan D.J. 1998. "Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin". *J Appl Microbiol* 85:512-20.
- Anike N. and Okafor, N., 2008. "Secretion of Methionine by Microorganism Associated with Cassava Fermentation", *African Journal of Food Agri. Nutr. and Development* 8: 77-90.
- Axelsson L. 2004. "Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, editors. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*". 3rd rev. and exp.ed. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 1-66.
- Bertolini, A. C., Mestres, C. and Colona, P., 2000, *Rheological Properties of Acidified and UV-irradiated Starches*, *Starch* 52 340-344.

- Camargo, C., Colona, P., Buleon, A. and Molard, D. R., 1988, "Functional Properties of Sour Cassava (*Manihot utilissima*) Starch: Polvilho Azedo.", *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 429-435
- Demiati, Z. M., Dupuy, N., Huvenne, J. P., Cereda, M. P. and Wosiacki, G., 2000, "Relationship Between Baking Behavior of Modified Cassava Starches and Starch Chemical Structure Determined by FTIR Spectroscopy", *Carbohydrate Polymer* 42: 149-158.
- Giraud, E., Champallier, A. and Raimbault, M. 1994. "Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*", *Appl Environ Microbiol.* 60:4319-23
- Gunaratne, A and Corke, H. 2007. "Influence of prior acid treatment on acetylation of wheat, potato and maize starch". *Food Chemistry* 105: 917-925.
- Guyot, J. P. and Morlon-Guyot, J., 2001, *Effect of Different Cultivation Conditions on Lactobacillus manihotivorans OND32T, an Amylolytic Lactobacillus Isolated from Sour Starch Cassava Fermentation*, *International Journal of Food Microbiology* 67: 217-225.
- Guyot, J. P., Brizuela, M. A., Rodriguez-Sanoya, R. and Morlon-Guyot, J., 2003, *Characterization and Differentiation of Lactobacillus manihotivorans Strains Isolated from Cassava Sour Starch*, *International Journal of Food Microbiology* 87: 187-192.
- Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth L., and Schillinger, U. 2001. "Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition". *Am J Clin Nutr* 73 (2): 365S-373S.
- Lacerda, I. C.A., Miranda, R.L., Borelli, B.M., Nunes, A.C., Nardi, R.M.D., Lachance, M.A. and Rosa, C.A., 2005, "Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil", *International Journal of Food Microbiology* 105: 213-219.
- Lee, J.S., Kumar, R.N., Rozman, H.D. and Azemi, B.M.N., 2005, *Pasting, swelling and solubility properties of UV initiated starch-graft-poly (AA)*, *Food Chemistry* 91: 203 - 211.
- Marcon, M.J.A., Vieira, M.A., Santos, K. De Simas, K.N., Amboni, R.D.M.C. and Amante, E.R. 2006. "The effect of fermentation on cassava starch microstructure". *Journal of Food Process Engineering* 29: 362-372.
- Morlon-Guyot I., Guyot J.P., Pot, B., Jacobe de Haut, I., Raimbault, M. 1998. "*Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation". *Int J Syst Bacteriol* 48:1101-9.
- Nakamura, L.K. 1981. "*Lactobacillus amylolyticus*. A new starch hydrolyzing species from swine waste corn fermentation". *Dev Ind Microbiol* 20:531-40
- Naveena, B.J, Vishnu, C., Altaf, Md, and Reddy G. 2003. "Wheat bran an inexpensive substrate for production of lactic acid in solid state Fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6-optimization of fermentation conditions". *J Sci Ind Res* 62:453-6.
- Nwankwo D, Anadu E and Usoro R. 1989. "Cassava fermenting organisms". *MIRCEN J* 5:169-79.

- Plata-Oviedo, M. and Camargo, C., 1998, "Effect of Acid Treatments and Drying Processes on Physico-chemical Functional Properties of Cassava Starch", *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 103-108.
- Reddy, G., Altaf, Md., Naveena, B.J., Venkateshwar, M. and Kumar, E.V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. *Biotechnology Advances* 26: 22-34
- Sanni A., Morlon-Guyot, J. and Guyot J.P. 2002, "New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods". *Int J Food Microbiol* 72:53-62

SERTIFIKAT

Seminar Nasional 2009

Diberikan kepada

Widya Dwi Rukmi Putri

Sebagai

Pemakalah

Tema Seminar

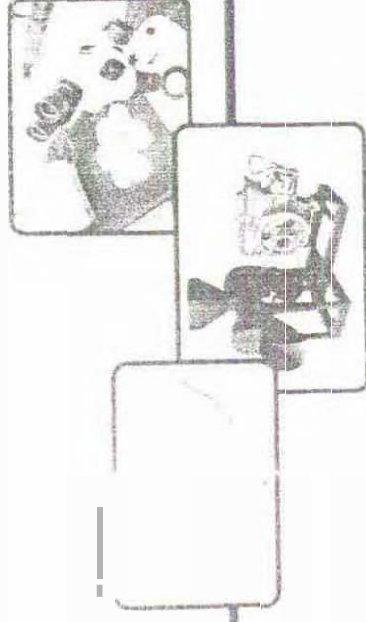
PENGEMBANGAN TEKNOLOGI BERBASIS BAHAN BAKULOKAL

Yogyakarta, 2 Desember 2009

Ketua Perhimpunan
Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI)
Cabang Yogyakarta

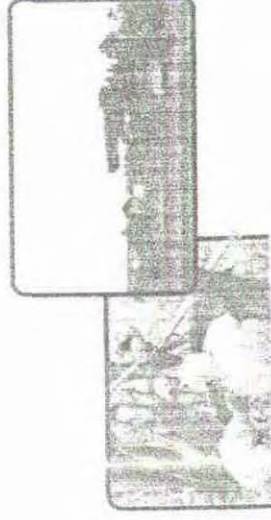
Dr. Ir. Eni Hamayani, MSc
NIP. 19630609 198710 2 001

Depdiknas
Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Depdiknas
Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
NIP. 19540227 198003 1 005



KERJASAMA :

- LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA (LIPI)
- FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN UGM
- PERHIMPUNAN AHLI TEKNOLOGI PANGAN INDONESIA (PATPI) CABANG YOGYAKARTA
- BADAN KETAHANAN PANGAN DAN PENYULUHAN (BKPP) PROPINSI DIY
- BANK INDONESIA (BI) YOGYAKARTA



Lampiran 3. Data Identifikasi dan Analisis



REFERENCE	DATE
Isola A4	12/8/09
COMMENT	

Strip	API 50 CHL V5.1
Profile+.....
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against									
Lactobacillus fermentum 2	99.4	0.78	LARA100%									
Next taxon	% ID	T	Tests against									
Lactobacillus fermentum 1	0.5	0.41	ESC	5%	CEL	1%	TRE	16%	SKG	1%		

 Print

API 50 CHL V5.1

-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49

REFERENCE DATE
Isolat B1 12/8/09
COMMENT

GOOD IDENTIFICATION

Strip
Profile
Note

API 50 CHL W8.1

----- + +----- + + + +----- + + + +----- +-----

Significant taxa	% ID	T	Tests against
Lactobacillus fermentum 1	98.5	0.92	
Next taxon	% ID	T	Tests against
Lactobacillus fermentum 2	1.1	9.87	ESC 81%

Close

Print

API 50 CHL V5.1

-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49

REFERENCE DATE
Isolat B9 12/8/09
COMMENT

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip API 50 CHL V5.1

Profile

Note

Significant taxa	% ID	T	Tests against
Lactobacillus plantarum 1	88.8	0.69	MLZ 92% AMC 7%
Next taxon	KID	T	Tests against
Lactobacillus brevis 1	0.1	0.48	SGR 14% AMD 0%

 Close

 Print

API 50 CHL V5.1

-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49

REFERENCE
L. plantarum FNCC
COMMENT

DATE
12/8/09

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip API 50 CHL V5.1
Profile

Note

Significant taxa	% ID	T	Tests against
Lactobacillus plantarum 1	99.3	0.93	
Next taxon	% ID	T	Tests against
Lactobacillus pentosus	0.6	0.66	GLY 75% DXYL100% RHA 25% MLZ 25%

Close

Print

Jl. Tentara Pelajar No. 12
Komplek Pertanian Cimanggu, Bogor

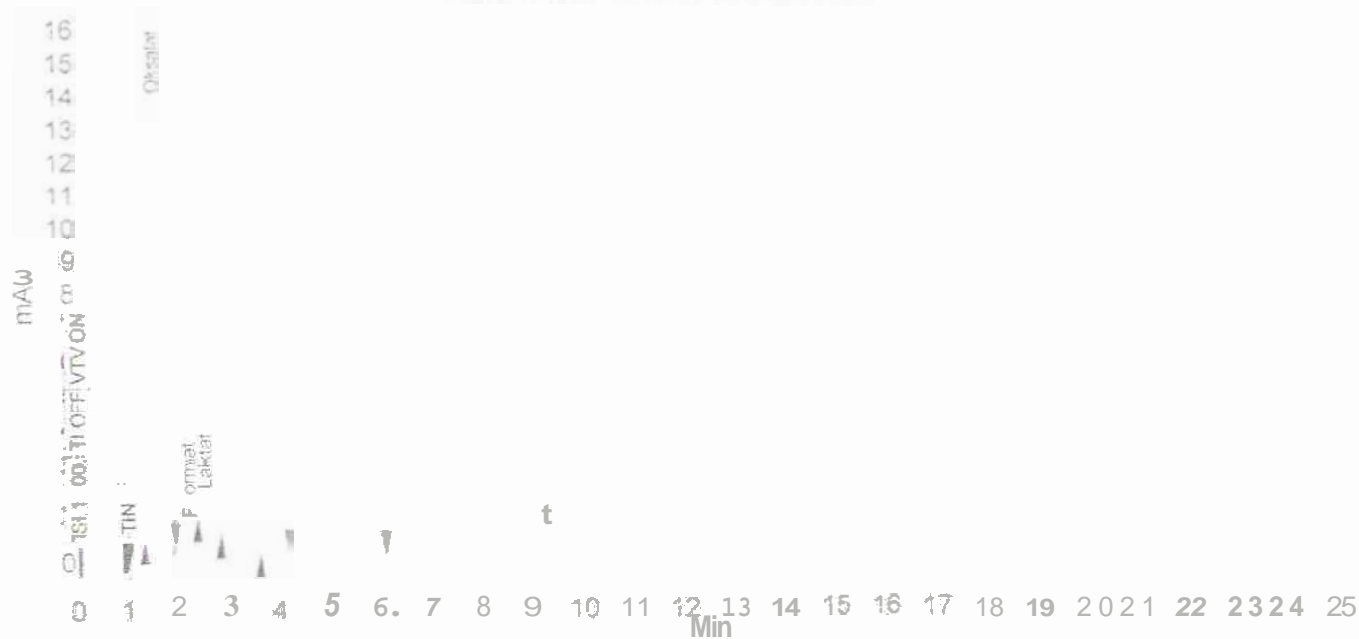
Chromatogram : 223161

System Varian 940-LC
Method : Test UV AS asam organik
User Yudi

Acquired 12/1/2009 1:00:33 PM
Processed 12/3/2009 9:23:16 AM
Printed 12/3/2009 9:23:24 AM

Chromatogram :

22361.DATA - UV-Vis-Channel-1



Peak Results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [ppm]	Height [mAU]	Area [mAU Min]	Area % [%]
2	Oksalat	1.49	619.44	15.2	2.2	41.126
3	Formiat	2.19	66.33	0.5	0.1	1.766
4	Laktat	2.51	115.76	0.9	0.2	3.023
Total			801.53	21.1	5.3	100.000

Jl. Tentara Pelajar No. 12
Komplek Pertanian Cimanggu, Bogor

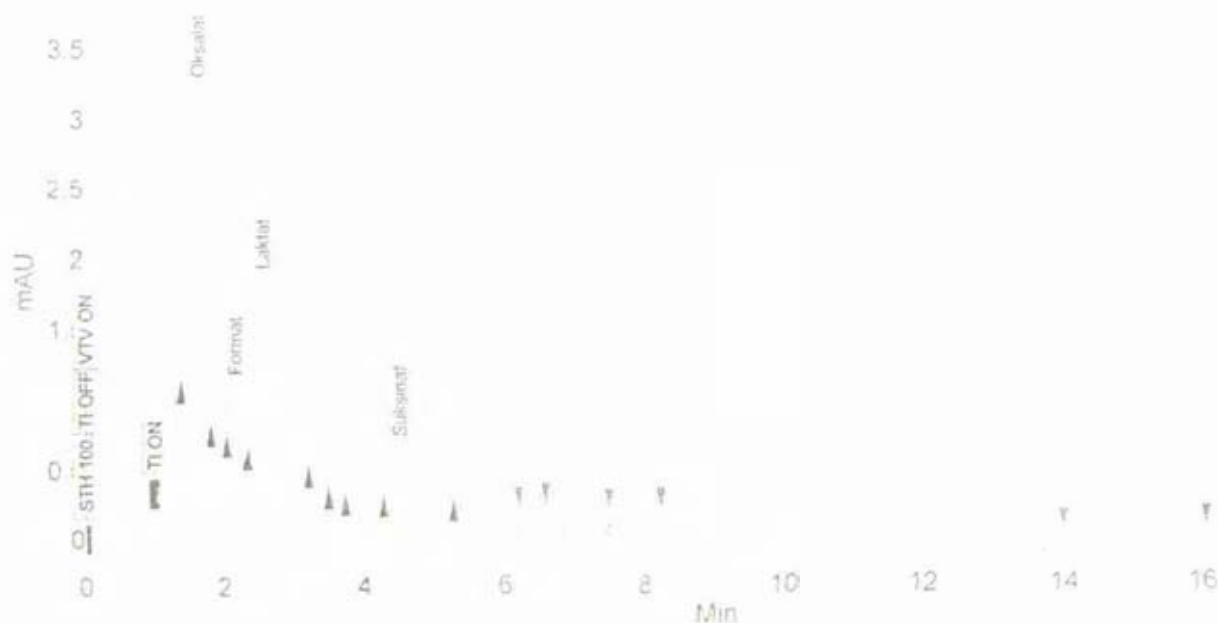
Chromatogram : 22381

System Varian 940-LC
Method Test UV AS asam organik
User Yudi

Acquired 12/1/2009 1:55:16 PM
Processed 12/3/2009 9:25:45 AM
Printed 12/3/2009 9:25:58 AM

Chromatogram :

22381.DATA - UV-Vis-Channel-1



Peak Results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [ppm]	Height [mAU]	Area [mAU Min]	Area % [%]
2	Oksalat	1.52	123.89	2.7	0.4	30.551
4	Format	2.16	41.54	0.4	0.1	4.113
5	Laktat	2.56	266.95	1.2	0.4	25.918
9	Sukinat	4.50	170.04	0.3	0.1	7.605
1000			150.00	0.2	0.1	100.000

LABORATORIUM PENGUJIAN BALAI WESAR PASCAPANEN

Jl Tentara Pelajar No. 12
Komplek Pertanian Cimanggu, Bogor

Chromatogram : 22351

System: Varian 940-LC
Method: Test UV AS asam organik
User: Yudi

Acquired: 12/1/2009 12:39:03 PM
Processed: 12/3/2009 9:21:49 AM
Printed: 12/3/2009 9:21:55 AM

Chromatogram :



Peak Results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [ppm]	Height [mAU]	Area [mAU.Min]	Area % [%]
2	Oksalat	1.59	943.07	23.3	3.3	74.718
3	Format	2.33	228.65	1.4	0.3	2.267
4	Laktat	2.66	212.86	1.6	0.3	6.533
Total			1384.58	26.3	3.9	100.000

LABORATORIUM PENGUJIAN BALAI BESAR PASCAPANEN

Jl. Tentara Pelajar No. 12
Komplek Pertanian Cimanggu, Bogor

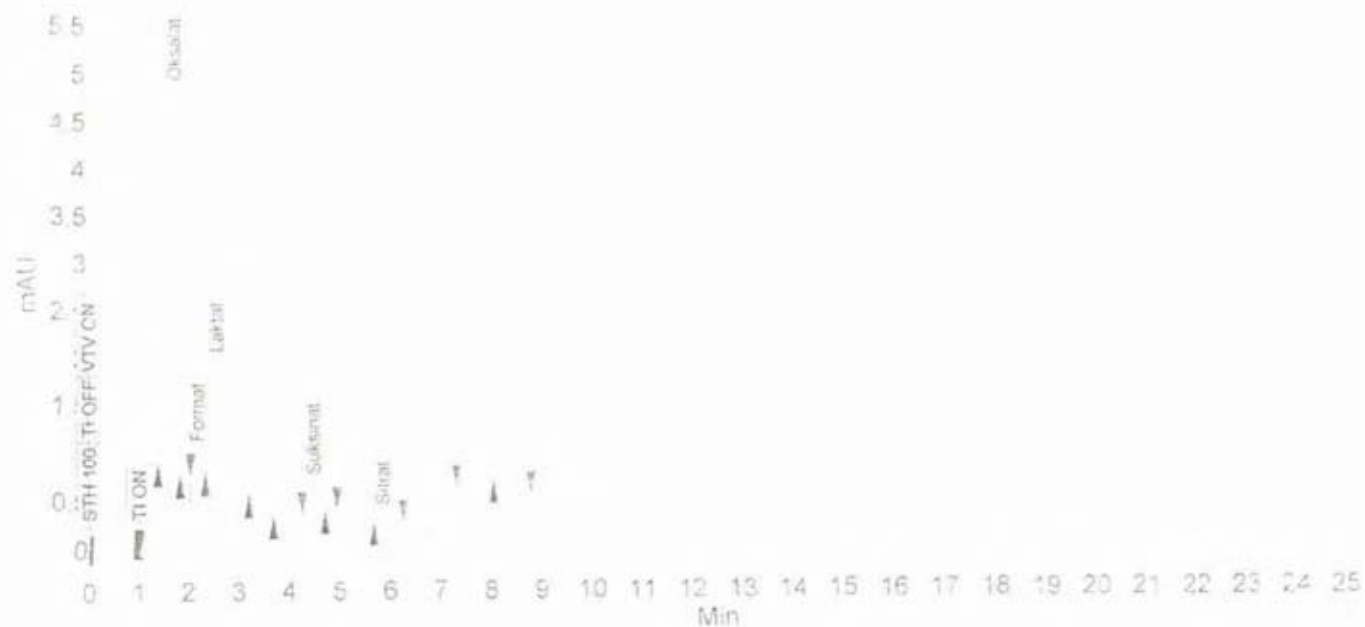
Chromatogram : 22371

System : Varian 940-LC
Method : Test UV AS asam organik
User : Yudi

Acquired : 12/1/2009 1:27:55 PM
Processed : 12/3/2009 9:24:00 AM
Printed : 12/3/2009 9:24:04 AM

Chromatogram :

22371 DATA - UV-Vis-Channel-1



Peak Results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [ppm]	Height [mAU]	Area [mAU Min]	Area % [%]
2	Oksalat	1.52	204.31	4.7	0.7	42.471
4	Format	2.17	27.62	0.3	0.0	2.303
5	Laktat	2.56	237.05	1.2	0.3	19.382
8	Suksinat	4.47	86.28	0.3	0.1	3.250
11	Sitrat	5.63	21.63	0.1	0.0	1.480
Total			576.79	9.6	1.7	100.000